(19) Евразийское патентное ведомство

(21) 202391711 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.10.09

(22) Дата подачи заявки
2021.12.10

(51) Int. Cl. ***C12N 5/0783*** (2010.01)
C12N 9/22 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)
C12N 15/11 (2006.01)
C07K 14/705 (2006.01)
C12N 15/90 (2006.01)
A61K 35/17 (2015.01)
C12N 15/10 (2006.01)
C07K 14/74 (2006.01)
C07K 14/725 (2006.01)

(54) КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ СНИЖЕНИЯ СОДЕРЖАНИЯ MHC КЛАССА II В КЛЕТКЕ

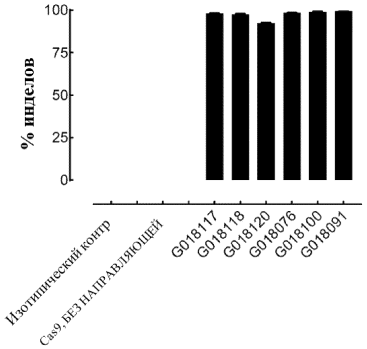
(31) **63/124,064; 63/130,106**
(32) **2020.12.11; 2020.12.23**
(33) **US**
(86) **PCT/US2021/062946**
(87) **WO 2022/125982 2022.06.16**

(71) Заявитель:
ИНТЕЛЛИА ТЕРАПЬЮТИКС, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
Сридхар Сриджани, Чжан Юн, Харрингтон Уилльям Фредерик, Гоел Сурбхи (US)

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(57) Композиции и способы снижения экспрессии белка MHC класса II в клетке, включающие генетическую модификацию CIITA для применения, например, в терапии на основе адоптивного переноса клеток.



202391711 A1

202391711 A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-578321EA/061

КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ СНИЖЕНИЯ СОДЕРЖАНИЯ МНС КЛАССА II В КЛЕТКЕ

[0001] Данная заявка испрашивает приоритет в соответствии с 35 U.S.C. 119(e) предварительной заявки США № 63/124 064, поданной 11 декабря 2020 года, и предварительной заявки США № 63/130 106, поданной 23 декабря 2020 года; где каждая из заявок включена в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

[0002] Данная заявка подана совместно с Перечнем последовательностей в электронном формате. Перечень последовательностей представлен в виде файла под названием «2021-12-10_01155-0034-00PCT_Seq_List_ST25.txt», созданного 10 декабря 2021 г. и имеющего размер 392 081 байт. Информация в электронном формате перечня последовательностей в полном объеме включена в данный документ посредством ссылки.

ВВЕДЕНИЕ И КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0003] Способность подавлять МНС класса II имеет решающее значение для многих применений in vivo и ex vivo, *например*, при применении аллогенных клеток (полученных от донора) для трансплантации и/или, *например*, для создания клеточной популяции in vitro, которая не активирует Т-клетки. В частности, перенос аллогенных клеток субъекту представляет большой интерес в области клеточной терапии. Применение аллогенных клеток было ограничено из-за проблемы отторжения иммунными клетками реципиента, которые распознают трансплантированные клетки как чужеродные и атакуют их. Во избежание проблемы иммунного отторжения, разработчики клеточной терапия сосредоточились на аутологичных подходах, которые используют собственные клетки субъекта в качестве источника клеток для терапии, что требует много времени и средств.

[0004] Как правило, иммунное отторжение аллогенных клеток является результатом несоответствия молекул главного комплекса гистосовместимости (МНС) между донором и реципиентом. В человеческой популяции молекулы МНС существуют в различных формах, включая, *например*, многочисленные генетические варианты любого заданного гена МНС, *т. е.* аллели, кодирующие различные формы белка МНС. Основные классы молекул МНС называются МНС класса I и МНС класса II. Молекулы МНС класса I (*например*, HLA-A, HLA-B и HLA-C у человека) экспрессируются на всех ядерных клетках и представляют антигены для активации цитотоксических Т-клеток (CD8+ Т-клеток или CTL). Молекулы МНС класса II (*например*, HLA-DP, HLA-DQ и HLA-DR у человека) экспрессируются только на определенных типах клеток (*например*, В-клетках, дендритных клетках и макрофагах) и представляют антигены для активации хелперных Т-клеток (CD4+ Т-клеток или Th-клеток), которые, в свою очередь, передают сигналы В-клеткам для выработки антител.

[0005] Незначительные различия, *например*, в аллелях МНС между индивидуумами, могут вызвать активацию Т-клеток у реципиента. Во время развития Т-клеток, репертуар Т-клеток индивидуума толерантен к собственным молекулам МНС, но

Т-клетки, которые распознают молекулы MHC другого индивидуума, могут сохраняться в кровотоке и называются аллореактивными Т-клетками. Аллореактивные Т-клетки могут активироваться, *например*, при наличии в организме клеток другого индивидуума, экспрессирующих молекулы MHC, вызывая, *например*, болезнь «трансплантат против хозяина» и отторжение трансплантата.

[0006] Способы и композиции для снижения чувствительности аллогенной клетки к отторжению представляют интерес, включая, *например*, снижение ее экспрессии белка MHC, чтобы избежать реакции Т-клеток реципиента. На практике возможность генетически модифицировать аллогенную клетку для трансплантации в организм была ограничена необходимостью проводить несколько редактирования генов, чтобы снизить экспрессию всех белков MHC, и в то же время избежать других вредных иммунных реакций реципиента. Например, хотя стратегии удаления белка MHC класса I могут снизить активацию CTL, клетки, которые не имеют MHC класса I на своей поверхности, подвержены разрушению натуральными киллерами (NK) иммунной системы, потому что активация NK-клеток регулируется ингибиторными рецепторами, специфичными для MHC класса I. Стратегии редактирования генов для истощения молекул MHC класса II также оказались сложными, особенно в определенных типах клеток, по причинам, включая низкую эффективность редактирования и низкую выживаемость клеток, что препятствует практическому применению в качестве клеточной терапии.

[0007] Таким образом, существует потребность в усовершенствованных способах и композициях для модификации аллогенных клеток, чтобы преодолеть проблему иммунного отторжения реципиента и технические трудности, связанные с несколькими генетическими модификациями, необходимыми для получения более безопасной клетки для трансплантации.

[0008] Данное изобретение предлагает сконструированные клетки со сниженной или устраненной поверхностной экспрессией MHC класса II. Сконструированная клетка содержит генетическую модификацию гена CIITA (трансактиватор главного комплекса гистосовместимости класса II), который может быть полезен в клеточной терапии. В описании дополнительно представлены композиции и способы для снижения или устранения поверхностной экспрессии белка MHC класса II в клетке путем генетической модификации гена CIITA. Белок CIITA действует как активатор транскрипции (активируя промотор MHC класса II) и необходим для экспрессии белка MHC класса II. В некоторых вариантах осуществления в описании дополнительно предложены композиции и способы для снижения или устранения поверхностной экспрессии белка MHC класса I в клетке путем генетической модификации B2M (β-2-микроглобулина). Белок B2M образует гетеродимер с молекулами MHC класса I и необходим для экспрессии белка MHC класса I на клеточной поверхности. В изобретении дополнительно предложена экспрессия молекулы ингибитора NK-клеток клеткой для снижения или устранения литической активности NK-клеток. В некоторых вариантах осуществления способы и композиции дополнительно предусматривают вставку экзогенной нуклеиновой кислоты, *например*,

кодирующей нацеливающий рецептор, другой полипептид, экспрессируемый на клеточной поверхности, или полипептид, который секретируется из клетки. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления сконструированная клетка используется в качестве «клеточной фабрики» для секреции экзогенного белка у реципиента. В некоторых вариантах осуществления сконструированная клетка используется в качестве адоптивной клеточной терапии.

[0009] В некоторых вариантах осуществления предложена сконструированная клетка, в которой снижена или устранена поверхностная экспрессия MHC класса II по сравнению с немодифицированной клеткой, причем сконструированная клетка содержит генетическую модификацию в гене CIITA, где генетическая модификация содержит по меньшей мере один нуклеотид сайт сплайсинга в пределах геномных координат chr16:10902171-10923242. В некоторых вариантах осуществления генетическая модификация включает модификацию по меньшей мере одного нуклеотида акцепторного сайта сплайсинга. В некоторых вариантах осуществления один нуклеотид представляет собой A. В некоторых вариантах осуществления один нуклеотид представляет собой G. В некоторых вариантах осуществления генетическая модификация включает модификацию по меньшей мере одного нуклеотида донорного сайта сплайсинга. В некоторых вариантах осуществления один нуклеотид представляет собой G. В некоторых вариантах осуществления один нуклеотид представляет собой T. В некоторых вариантах осуществления генетическая модификация включает модификацию нуклеотида, граничащего с сайтом сплайсинга.

[0010] В некоторых вариантах осуществления предложена сконструированная клетка, в которой снижена или устранена поверхностная экспрессия MHC класса II по сравнению с немодифицированной клеткой, причем сконструированная клетка содержит генетическую модификацию в гене CIITA, где генетическая модификация содержит индел, замену C на T или замену A на G в пределах геномных координат, выбранных из: chr16:10895410-10895430, chr16:10898649-10898669, chr16:10898658-10898678, chr16:10902171-10902191, chr16:10902173-10902193, chr16:10902174-10902194, chr16:10902179-10902199, chr16:10902183-10902203, chr16:10902184-10902204, chr16:10902644-10902664, chr16:10902779-10902799, chr16:10902788-10902808, chr16:10902789-10902809, chr16:10902790-10902810, chr16:10902795-10902815, chr16:10902799-10902819, chr16:10903708-10903728, chr16:10903713-10903733, chr16:10903718-10903738, chr16:10903721-10903741, chr16:10903723-10903743, chr16:10903724-10903744, chr16:10903873-10903893, chr16:10903878-10903898, chr16:10903905-10903925, chr16:10903906-10903926, chr16:10904736-10904756, chr16:10904790-10904810, chr16:10904811-10904831, chr16:10906481-10906501, chr16:10906485-10906505, chr16:10906486-10906506, chr16:10906487-10906507, chr16:10906492-10906512, chr16:10908127-10908147, chr16:10908130-10908150, chr16:10908131-10908151, chr16:10908132-10908152, chr16:10908137-10908157, chr16:10908138-10908158, chr16:10908139-10908159, chr16:10909006-10909026,

chr16:10909007-10909027, chr16:10909018-10909038, chr16:10909021-10909041, chr16:10909022-10909042, chr16:10909172-10909192, chr16:10910165-10910185, chr16:10910176-10910196, chr16:10910186-10910206, chr16:10915547-10915567, chr16:10915551-10915571, chr16:10915552-10915572, chr16:10915567-10915587, chr16:10916348-10916368, chr16:10916359-10916379, chr16:10916362-10916382, chr16:10916449-10916469, chr16:10916450-10916470, chr16:10916455-10916475, chr16:10916456-10916476, chr16:10918423-10918443, chr16:10918504-10918524, chr16:10918511-10918531, chr16:10918512-10918532, chr16:10918539-10918559, chr16:10922153-10922173, chr16:10922478-10922498, chr16:10922487-10922507, chr16:10922499-10922519, chr16:10923205-10923225, chr16:10923214-10923234, chr16:10923218-10923238, chr16:10923219-10923239, chr16:10923220-10923240, chr16:10923221-10923241 и chr16:10923222-10923242. В некоторых вариантах осуществления генетическая модификация включает по меньшей мере один нуклеотид сайта сплайсинга в пределах геномных координат, выбранных из: chr16:10908132-10908152, chr16:10908131-10908151, chr16:10916456-10916476, chr16:10918504-10918524, chr16:10909022-10909042, chr16:10918512-10918532, chr16:10918511-10918531, chr16:10895742-10895762, chr16:10916362-10916382, chr16:10916455-10916475, chr16:10909172-10909192, chr16:10906492-10906512, chr16:10909006-10909026, chr16:10922478-10922498, chr16:10895747-10895767, chr16:10916348-10916368, chr16:10910186-10910206, chr16:10906481-10906501, chr16:10909007-10909027, chr16:10895410-10895430 и chr16:10908130-10908150. В некоторых вариантах осуществления генетическая модификация включает по меньшей мере один нуклеотид сайта сплайсинга в пределах геномных координат, выбранных из: chr16:10918504-10918524, chr16:10923218-10923238, chr16:10923219-10923239, chr16:10923221-10923241, chr16:10906485-10906505, chr16:10916359-10916379, chr16:10903873-10903893, chr16:10909172-10909192, chr16:10922153-10922173, chr16:10916450-10916470, chr16:10923222-10923242, chr16:10916449-10916469 и chr16:10923214-10923234. В некоторых вариантах осуществления генетическая модификация включает по меньшей мере один нуклеотид сайта сплайсинга в пределах геномных координат, выбранных из: chr16:10918504-10918524, chr16:10923218-10923238, chr16:10923219-10923239, chr16:10923221-10923241, chr16:10906485-10906505, chr16:10916359-10916379, chr16:10903873-10903893, chr16:10909172-10909192, chr16:10922153-10922173 и chr16:10916450-10916470.

[0011] В некоторых вариантах осуществления предложена композиция, содержащая: a) CIITA-направленную РНК, содержащую направляющую последовательность, которая i) нацелена на геномную целевую последовательность CIITA, содержащую по меньшей мере один нуклеотид сайта сплайсинга, или ii) направляет РНК-направляемый ДНК-связывающий агент сделать разрез в геномной целевой последовательности CIITA, которая находится на расстоянии 5 нуклеотидов или менее от нуклеотида, граничащего с сайтом сплайсинга; где CIITA-направленная РНК

нацелена на геномную целевую последовательность CIITA, содержащую по меньшей мере 10 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат chr16:10902171-10923242.

[0012] В некоторых вариантах осуществления предложена композиция, содержащая: a) CIITA-направленную РНК (нРНК), содержащую i) направляющую последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1-101; или ii) по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 1-101; или iii) направляющую последовательность, по меньшей мере, на 95%, 90% или 85% идентичную последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 1-101; или iv) последовательность, которая включает 10 смежных нуклеотидов ±10 нуклеотидов геномных координат, указанных в Таблице 1; или v) по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов последовательности из (iv); или vi) направляющую последовательность, которая по меньшей мере на 95%, 90% или 85% идентична последовательности, выбранной из (v).

[0013] В некоторых вариантах осуществления предложена композиция, содержащая: a) CIITA-направленную РНК, которая представляет собой одиночную направляющую РНК (онРНК), содержащую i) направляющую последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1-101; или ii) по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 1-101; или iii) направляющую последовательность, по меньшей мере на 95%, 90% или 85% идентичную последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 1-101; или iv) последовательность, которая включает 10 смежных нуклеотидов ±10 нуклеотидов геномных координат, указанных в Таблице 1; или v) по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов последовательности из (iv); или vi) направляющую последовательность, которая по меньшей мере на 95%, 90% или 85% идентична последовательности, выбранной из (v).

[0014] В некоторых вариантах осуществления предложен способ получения сконструированной клетки, в которой снижена или устранена поверхностная экспрессия белка MHC класса II по сравнению с немодифицированной клеткой, причем способ включает приведение клетки в контакт с композицией в соответствии с любым из вариантов осуществления, предложенных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления композиция содержит CIITA-направленную РНК, содержащую нуклеотидную последовательность, выбранную из: SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 80, SEQ ID NO: 82, SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 87, SEQ ID NO: 91, SEQ ID NO: 96, SEQ ID NO: 97, SEQ ID NO: 98, SEQ ID NO: 100 и SEQ ID NO: 101. В некоторых вариантах осуществления композиция содержит CIITA-направленную РНК, содержащую нуклеотидную последовательность, выбранную из: SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 80, SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 87, SEQ ID NO: 91, SEQ ID NO: 97, SEQ ID NO: 98 и SEQ ID NO: 100.

[0015] В некоторых вариантах осуществления предложен способ снижения поверхностной экспрессии белка MHC класса II в сконструированной клетке по сравнению с немодифицированной клеткой, включающий приведение клетки в контакт с

композицией в соответствии с любым из вариантов осуществления, предложенных в данном документе.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[0016] На Фиг. 1A-D показаны результаты скрининга Т-клеток, сравнивающие редактирование CIITA-направленными РНК (Фиг. 1A (для кливазы Cas9 (Cas9)) и Фиг. 1B (дезаминаза (BC22)) со средним процентом Т-клеток, отрицательных в отношении экспрессии на клеточной поверхности MHC класса II («% отрицательных по MHC II») по данным проточной цитометрии для Cas9 (Фиг. 1C) и BC22 (Фиг. 1D).

[0017] На Фиг. 2 показан средний процент Т-клеток, отрицательных в отношении экспрессии на клеточной поверхности MHC класса II («% отрицательных по MHC II») для нескольких направляющих с использованием Cas9 и BC22, по отношению к расстоянию от сайта разреза до нуклеотида, граничащего с сайтом сплайсинга, показанному в виде пар нуклеотидов («п.н.»). Положительные числовые значения указывают на нуклеотид, граничащий с сайтом сплайсинга, 3’ от сайта разреза, тогда как отрицательные числовые значения указывают на нуклеотид, граничащий с сайтом сплайсинга, 5’ от сайта разреза.

[0018] На Фиг. 3A-3D показан профиль редактирования Т-клеток в процентах от общего числа считываний при различных уровнях мРНК BC22n («BC22n», как используется в данном документе, относится к BC22 без UGI) и мРНК Cas9. Клетки редактировали отдельными направляющими РНК G015995 (Фиг. 3A), G016017 (Фиг. 3B), G016206 (Фиг. 3C) и G018117 (Фиг. 3D).

[0019] На Фиг. 4A-4D показан профиль редактирования для Т-клеток в процентах от общего числа считываний при различных уровнях мРНК BC22n и мРНК Cas9, когда для редактирования одновременно использовали четыре направляющие РНК. Процент от общего числа считываний с доставкой с несколькими направляющими показан для каждого из четырех локусов, на которые нацелены G015995 (Фиг. 4A), G016017 (Фиг. 4B), G016206 (Фиг. 4C) и G018117 (Фиг. 4D).

[0020] На Фиг. 5A-5H показывают результаты фенотипирования в виде процента клеток, отрицательных в отношении связывания антител, с увеличением общей РНК для образцов BC22n и Cas9 (как показано в Таблице 14). На Фиг. 5A показан процент B2M-отрицательных клеток, когда для редактирования использовали B2M-направленную G015995. На Фиг. 5B показан процент B2M-отрицательных клеток, когда для редактирования использовали несколько направляющих. На Фиг. 5C показан процент CD3-отрицательных клеток, когда для редактирования использовали TRAC-направленную G016017. На Фиг. 5D показан процент CD3-отрицательных клеток, когда для редактирования использовали TRBC-направленную G016206. На Фиг. Фиг. 5E показан процент CD3-отрицательных клеток, когда редактирования использовали несколько направляющих. На Фиг. 5F показан процент клеток, отрицательных по MHC класса II, когда для редактирования использовали CIITA-направленную G018117. На Фиг. На Фиг. 5G показан процент клеток, отрицательных по MHC класса II, когда редактирования использовали несколько направляющих. На Фиг. 5H показан процент тройных

отрицательных (по B2M, CD3, MHC II) клеток, когда для редактирования использовали несколько направляющих.

[0021] На Фиг. 6A-6B показан профиль редактирования в Т-клетках после обработки различными конструкциями мРНК и CIITA-нацеленными онРНК (Фиг. 6A), и клетки, отрицательные по MHC класса II, оцененные с помощью анализа проточной цитометрии Т-клеток, обработанных различными конструкциями мРНК и CIITA-направленными РНК (Фиг. 6B).

[0022] На Фиг. 7A-7D показаны графики рассеяния, показывающие статистически значимые (*=p. скор. <0,05) события дифференциальной экспрессии генов (черные точки) в Т-клетках, обработанных первой направляющей, мРНК UGI и либо мРНК Cas9 (Фиг. 7A), либо мРНК BC22n (Фиг. 7B), или второй направляющей, мРНК UGI и либо мРНК Cas9 (Фиг. 7C), либо мРНК BC22n (Фиг. 7D).

[0023] На Фиг. 8A-8D показаны сети белок-белковых взаимодействий, обогащенные среди списка дифференциально экспрессируемых генов в Т-клетках, обработанных первой направляющей, мРНК UGI и либо мРНК Cas9 (Фиг. 8A), либо мРНК BC22n (Фиг. 8B), или второй направляющей, мРНК UGI и либо мРНК Cas9 (Фиг. 8C), либо мРНК BC22n (Фиг. 8D).

[0024] На Фиг. 9A-9C показано выживание Т-клеток с нокаутом B2M и Т-клеток с нокаутом B2M/HLA-E через 90 дней после введения (Фиг. 9A), в течение 90-дневного периода времени (Фиг. 9B) и в течение 30-дневного периода времени (Фиг. 9C) в мышиной модели уничтожения NK-клетками с помощью системы визуализации in vivo (IVIS); сигнал IVIS количественно оценивали как среднюю интенсивность излучения. Показаны точки данных для отдельных мышей (1-8).

[0025] На Фиг. 10A-10B показан процент редактирования CIITA, B2M и TRAC в Т-клетках с помощью NGS-секвенирования перед обработкой на основе магнитного разделения клеток (MACS®) (Фиг. 10A) и после обработки MACS® (Фиг. 10B).

[0026] На Фиг. 11A-11B показан средний процент Т-клеток, отрицательных в отношении экспрессии на клеточной поверхности MHC класса II, B2M и TRAC, по данным проточной цитометрии до обработки MACS® (Фиг. 11A) и после обработки MACS® (Фиг. 11B).

[0027] На Фиг. 12 показаны хромосомные структурные вариации в генетически модифицированных клетках, обработанных электропорацией, одновременной обработкой ЛНП или последовательной обработкой ЛНП, с помощью анализа KromaTiD dGH.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0028] В данном изобретении предложены сконструированные клетки, а также способы и композиции для генетической модификации клетки с целью получения сконструированной клетки и популяций сконструированных клеток, которые можно использовать, например, для терапии на основе адоптивного переноса клеток (АПК). Предложенное в данном документе изобретение преодолевает определенные препятствия предшествующих способов, предоставляя способы и композиции для генетической

модификации CIITA для снижения экспрессии белка MHC класса II на поверхности клетки. В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к сконструированным клеткам со сниженной или устраненной поверхностной экспрессией MHC класса II в результате генетической модификации гена CIITA. В некоторых вариантах осуществления в данном изобретении предложены композиции и способы для снижения или устранения экспрессии белка MHC класса II, а также композиции и способы для дальнейшего снижения восприимчивости клеток к иммунному отторжению. Например, в некоторых вариантах осуществления способы и композиции включают снижение или устранение поверхностной экспрессии белка MHC класса II путем генетической модификации CIITA и снижение или устранение поверхностной экспрессии белка MHC класса I и/или вставку экзогенной нуклеиновой кислоты, кодирующей молекулу ингибитора NK-клеток, или нацеливающий рецептор, или другой полипептид (экспрессируемый на клеточной поверхности или секретируемый), в клетку путем генетической модификации. Композиции сконструированных клеток, полученные способами, описанными в данном документе, обладают желаемыми свойствами, включающими, *например*, сниженную экспрессию молекул MHC, сниженную иммуногенность in vitro и in vivo, повышенную выживаемость и повышенную генетическую совместимость с более крупными субъектами для трансплантации.

[0029] Термин «примерно» или «приблизительно» означает приемлемую ошибку для конкретного значения, определенную специалистом в данной области техники, которая частично зависит от того, как значение измеряется или определяется, или степень вариации, которая существенно не влияет на свойства описываемого предмета или в пределах допусков, принятых в данной области техники, *например*, в пределах 10%, 5%, 2% или 1%. Соответственно, если не указано иное, числовые параметры, приведенные в последующем описании и прилагаемой формуле изобретения, являются приблизительными и могут варьироваться в зависимости от необходимых свойств, которые стремятся получить. Как минимум, что не стоит трактовать как попытку ограничить применение доктрины эквивалентов объемом формулы изобретения, каждый числовой параметр необходимо, по меньшей мере, толковать с учетом числа приведенных значимых цифр и путем применения обычных методов округления.

Определения

[0030] Если не указано иное, следующие термины и фразы, применяемые в данном документе, имеют следующие значения:

[0031] Применяемый в настоящем документе термин «или их комбинации» относится ко всем перестановкам и комбинациям перечисленных терминов, предшествующих этому термину. Например, «A, B, C или их комбинации» включает по меньшей мере один из: A, B, C, AB, AC, BC или ABC, и, если порядок важен в конкретном контексте, также BA, CA, CB, ACB, CBA, BCA, BAC или CAB. Продолжая этот пример, явно включены комбинации, которые содержат повторы одного или большего количества элементов или терминов, таких как BB, AAA, AAB, BBC, CBBA, CABA и так далее.

Специалист в данной области техники поймет, что обычно количество элементов или терминов в любой комбинации не ограничено, если иное не очевидно из контекста.

[0032] Применяемый в настоящем документе термин «набор» относится к упакованному набору связанных компонентов, таких как один или большее количество полинуклеотидов или композиций, и один или большее количество связанных материалов, таких как устройства для доставки (например, шприцы), растворители, растворы, буферы, инструкции, или осушители.

[0033] Применяемая в настоящем документе «аллогенная» клетка, относится к клетке, происходящей от субъекта-донора того же вида, что и субъект-реципиент, где субъект-донор и субъект-реципиент имеют генетические различия, *например*, гены в одном или большем количестве локусов, которые не идентичны. Таким образом, *например*, клетка является аллогенной по отношению к субъекту, которому эту клетку вводят. Применяемая в настоящем документе, клетка, которая удалена или изолирована от донора, которая не будет повторно введена исходному донору, считается аллогенной клеткой.

[0034] Применяемый в настоящем документе термин «аутологичная» клетка относится к клетке, полученной от того же субъекта, которому позднее будет повторно введен материал. Таким образом, *например*, клетка считается аутологичной, если ее удаляют у субъекта, а затем повторно вводят тому же субъекту.

[0035] «β2M» или «B2M», как применяется в настоящем документе, относится к последовательности нуклеиновой кислоты или белковой последовательности «β-2 микроглобулина»; ген человека имеет инвентарный номер NC_000015 (диапазон 44711492..44718877), ссылка GRCh38.p13. Белок B2M связан с молекулами MHC класса I в виде гетеродимера на поверхности ядерных клеток и необходим для экспрессии белка MHC класса I.

[0036] «CIITA», или «CIITA», или «C2TA», как применяется в настоящем документе, относится к последовательности нуклеиновой кислоты или белковой последовательности «трансактиватора главного комплекса гистосовместимости класса II»; ген человека имеет инвентарный номер NC_000016.10 (диапазон 10866208..10941562), ссылка GRCh38.p13. Белок CIITA в ядре действует как положительный регулятор транскрипции гена MHC класса II и необходим для экспрессии белка MHC класса II.

[0037] Используемый в данном документе термин «MHC» или «молекула(ы) MHC», или «белок MHC», или «комплекс(ы) MHC» относится к молекуле главного комплекса гистосовместимости (или во множественном числе) и включает, *например*, молекулы MHC класса I и MHC класса II. У людей молекулы MHC называются комплексами «лейкоцитарного антигена человека», или «молекулами HLA», или «белком HLA». Использование терминов «MHC» и «HLA» не предназначено для ограничения; используемый в данном документе термин «MHC» может использоваться для обозначения молекул MHC человека, *т.е.* молекул HLA. Поэтому термины «MHC» и «HLA» используются в данном документе взаимозаменяемо.

[0038] Применяемый в настоящем документе термин «HLA-A», в контексте белка HLA-A, относится к молекуле белка MHC класса I, которая представляет собой гетеродимер, состоящий из тяжелой цепи (кодируемой геном HLA-A) и легкой цепи (*например*, бета-2-микроглобулин). Применяемый в настоящем документе термин «HLA-A» или «ген HLA-A», в контексте нуклеиновых кислот, относится к гену, кодирующему тяжелую цепь молекулы белка HLA-A. Ген HLA-A также называют «гистосовместимостью HLA класса I, альфа-цепью»; ген человека имеет инвентарный номер NC_000006.12 (29942532..29945870). Известно, что ген HLA-A имеет тысячи различных версий (также называемых «аллелями») в популяции (и индивид может получить два разных аллеля гена HLA-A). Доступ к общедоступной базе данных аллелей HLA-A, включая информацию о последовательности, можно получить по адресу IPD-IMGT/HLA: https://www.ebi.ac.uk/ipd/imgt/hla/. Все аллели HLA-A охватываются терминами «HLA-A» и «ген HLA-A».

[0039] Применяемый в настоящем документе «HLA-B», в контексте нуклеиновых кислот, относится к гену, кодирующему тяжелую цепь молекулы белка HLA-B. HLA-B также называют «гистосовместимостью HLA класса I, альфа-цепью»; ген человека имеет инвентарный номер NC_000006.12 (31353875..31357179).

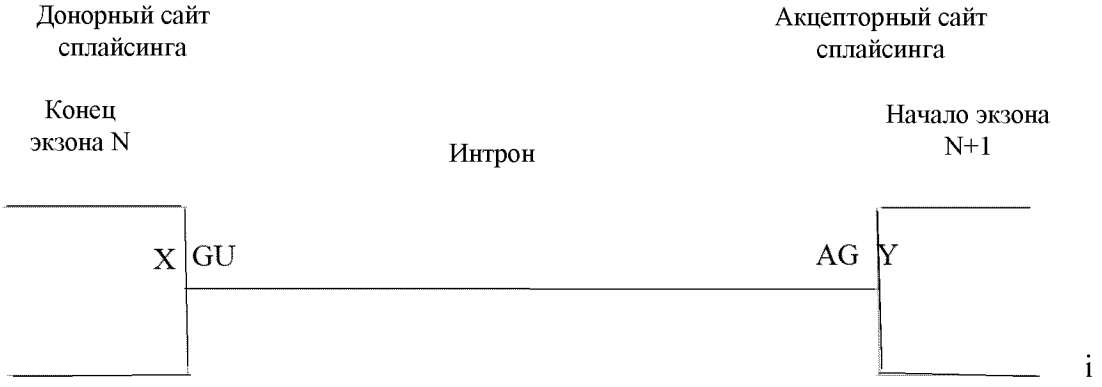
[0040] Применяемый в настоящем документе «HLA-C», в контексте нуклеиновых кислот, относится к гену, кодирующему тяжелую цепь молекулы белка HLA-C HLA-C также называют «гистосовместимостью HLA класса I, C альфа-цепью»; ген человека имеет инвентарный номер NC_000006.12 (31268749..31272092).

[0041] Применяемый в настоящем документе термин «в пределах геномных координат» включает границы заданного диапазона геномных координат. Например, если указано chr6:29942854- chr6:29942913, охватываются координаты chr6:29942854-chr6:29942913. В настоящей заявке геномные координаты, на которые делается ссылка, основаны на геномных аннотациях в сборке генома человека GRCh38 (также называемой hg38) от Консорциума справочных материалов по геномам, доступной на веб-сайте Национального центра биотехнологической информации. Инструменты и способы преобразования геномных координат между одной сборкой и другой известны в данной области техники и могут быть применены для преобразования предложенных в настоящем изобретении геномных координат в соответствующие координаты в другой сборке генома человека, включая преобразование в более раннюю сборку, сгенерированную тем же учреждением или с применением того же алгоритма (например, из GRCh38 в GRCh37), и преобразование сборки, созданной другим учреждением или алгоритмом (например, из GRCh38 в NCBI33, сгенерированный Международным консорциумом по секвенированию генома человека). Доступные способы и инструменты, известные в данной области техники, включают в себя, помимо прочего, Службу перераспределения генома NCBI, доступную на веб-сайте Национального центра биотехнологической информации, UCSC LiftOver, доступную на веб-сайте UCSC Genome Brower, и Assembly Converter, доступную на веб-сайте Ensembl.org.

[0042] Применяемый в настоящем документе термин «гомозиготный» относится к наличию двух идентичных аллелей определенного гена.

[0043] «Сайт сплайсинга», используемый в данном документе, относится к трем нуклеотидам, которые составляют акцепторный сайт сплайсинга или донорный сайт сплайсинга (определенные ниже), или к любым другим нуклеотидам, известным в данной области техники, которые являются частью сайта сплайсинга. *См. например*, Burset et al., Nucleic Acids Research 28(21):4364-4375 (2000) (описания канонических и неканонических сайтов сплайсинга в геномах млекопитающих). Три нуклеотида, составляющие «акцепторный сайт сплайсинга», представляют собой два консервативных остатка (*например*, AG у человека) на 3'-конце интрона и граничащий нуклеотид (*т. е.* первый нуклеотид на 3'-конце экзона AG). «Нуклеотид, граничащий с сайтом сплайсинга» акцепторного сайта сплайсинга обозначен как «Y» на приведенной ниже диаграмме и может также упоминаться в данном документе как «нуклеотид, граничащий с акцепторным сайтом сплайсинга» или «нуклеотид, граничащий с сайтом сплайсинга акцептора». Термины «акцепторный сайт сплайсинга», «сайт сплайсинга акцептора», «акцепторная последовательность сплайсинга» или «последовательность акцептора сплайсинга» могут использоваться в данном документе взаимозаменяемо.

[0044] Три нуклеотида, составляющие «донорный сайт сплайсинга», представляют собой два консервативных остатка (*например*, GT (ген) или GU (в РНК, такой как пре-мРНК) у человека) на 5'-конце интрона и граничащий нуклеотид (*т. е.* первый нуклеотид 5'-конце экзона GT). «Нуклеотид, граничащий с сайтом сплайсинга» донорного сайта сплайсинга обозначен как « X» на приведенной ниже диаграмме и может также упоминаться в данном документе как «нуклеотид, граничащий с донорным сайтом сплайсинга» или «нуклеотид, граничащий с сайтом сплайсинга донора». Термины «донорный сайт сплайсинга», «сайт сплайсинга донора», «донорная последовательность сплайсинга» или «последовательность донора сплайсинга» могут использоваться в данном документе взаимозаменяемо.



[0045] Используемый в данном документе термин «область сайта сплайсинга» включает нуклеотиды сайта сплайсинга, а также нуклеотиды, находящиеся вблизи сайта сплайсинга.

[0046] Используемый в данном документе термин «субъект» включает живые организмы, у которых может быть вызван иммунный ответ, включая, *например*, млекопитающих, приматов, людей.

[0047] В настоящем документе «полинуклеотид» и «нуклеиновая кислота» применяется для обозначения мультимерного соединения, включающего нуклеозиды или аналоги нуклеозидов, которые имеют азотсодержащие гетероциклические основания или аналоги оснований, связанные друг с другом вдоль основной цепи, включая обычные РНК, ДНК, смешанные РНК-ДНК и полимеры, которые являются их аналогами. «Скелет» нуклеиновой кислоты может состоять из различных связей, включая одну или большее количество связей сахар-фосфодиэфир, связей пептид-нуклеиновой кислоты («пептидные нуклеиновые кислоты» или PNA; PCT № WO 95/32305), фосфоротиоатных связей, метилфосфонатные связи или их комбинации. Фрагменты сахара нуклеиновой кислоты могут представлять собой рибозу, дезоксирибозу или аналогичные соединения с заменами, например, 2'-метокси- или 2'-галогенидными заменами. Азотистые основания могут представлять собой обычные основания (A, G, C, T, U), их аналоги (например, модифицированные уридины, такие как 5-метоксиуридин, псевдоуридин или N1-метилпсевдоуридин или другие); инозин; производные пуринов или пиримидинов (например, N^4-метилдезоксигуанозин, деаза- или аза-пурины, деаза- или аза-пиримидины, пиримидиновые основания с заместителями в позициях 5 или 6 (например, 5-метилцитозин), пуриновые основания с заместителем в позициях 2, 6 или 8, 2-амино-6-метиламинопурин, O^6-метилгуанин, 4-тиопиримидины, 4-аминопиримидины, 4-диметилгидразин-пиримидины и O^4-алкилпиримидины; патент США, № 5378825 и PCT № WO 93/13121). Для общего обсуждения см. The Biochemistry of the Nucleic Acids 5-36, Adams et al., ed., 11^{-e} изд., 1992). Нуклеиновые кислоты могут включать один или большее количество «основных» остатков, где основная цепь не включает азотистое основание для позиции(ий) полимера (патент США № 5585481). Нуклеиновая кислота может содержать только обычные сахара РНК или ДНК, основания и связи или может включать как обычные компоненты, так и замены (например, обычные основания с 2'-метоксисвязями или полимеры, содержащие как обычные основания, так и один или большее количество аналогов оснований). Нуклеиновая кислота включает «замкнутую нуклеиновую кислоту» (ЗНК), аналог, содержащий один или большее количество нуклеотидных мономеров ЗНК с бициклической фуранозной единицей, запертой в конформации РНК, имитирующей сахар, что повышает сродство к гибридизации с комплементарными последовательностями РНК и ДНК (Vester and Wengel, 2004, Biochemistry 43(42):13233-41). РНК и ДНК имеют разные фрагменты сахара и могут различаться наличием урацила или его аналогов в РНК и тимина или его аналогов в ДНК.

[0048] «Направляющая РНК», «нРНК» и просто «направляющая» применяется в данном документе взаимозаменяемо для обозначения, например, направляющей, которая направляет РНК-направляемый ДНК-связывающий агент к целевой ДНК и может представлять собой одиночную направляющую РНК или комбинацию crРНК и trРНК

(также известная как tracrРНК). Примеры нРНК включают направляющие РНК нуклеазы Cas класса II в модифицированной или немодифицированной формах. crРНК и trРНК могут быть связаны в виде одиночной молекулы РНК (одиночная направляющая РНК, онРНК) или в виде двух отдельных цепей РНК (двойная направляющая РНК, днРНК). Термин «направляющая РНК» или «нРНК» относится к каждому типу. trRNA может быть природной последовательностью или последовательностью trRNA с модификациями или вариациями по сравнению с природными последовательностями.

[0049] Применяемый в настоящем документе термин «направляющая последовательность» относится к последовательности в направляющей РНК, которая является комплементарной целевой последовательности и функционирует для направления направляющей РНК к целевой последовательности для связывания или модификации (например, расщепления) РНК-направляемым ДНК-связывающим агентом. «Направляющая последовательность» также может называться «нацеливающей последовательностью» или «спейсерной последовательностью». Направляющая последовательность может иметь длину 20 пар нуклеотидов, например в случае Streptococcus pyogenes (*m.e.* Cas9 Spy (SpCas9)) и родственных гомологов/ортологов Cas9. В качестве направляющих также можно использовать более короткие или длинные последовательности, например, длиной 15, 16, 17, 18, 19, 21, 22, 23, 24 или 25 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления целевая последовательность находится в гене или на хромосоме, например, и является комплементарной направляющей последовательности. В некоторых вариантах степень комплементарности или идентичности между направляющей последовательностью и соответствующей ей целевой последовательностью может составлять около 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%. В некоторых вариантах осуществления направляющая последовательность и целевая область могут быть на 100% комплементарными или идентичными. В других вариантах осуществления направляющая последовательность и целевая область могут содержать по меньшей мере одно несовпадение. Например, направляющая последовательность и целевая последовательность могут содержать 1, 2, 3 или 4 несовпадения, причем общая длина целевой последовательности составляет по меньшей мере 17, 18, 19, 20 или более пар оснований. В некоторых вариантах осуществления направляющая последовательность и целевая область могут содержать 1-4 несовпадений, причем направляющая последовательность содержит по меньшей мере 17, 18, 19, 20 или более нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления направляющая последовательность и целевая область могут содержать 1, 2, 3 или 4 несовпадения, причем направляющая последовательность содержит 20 нуклеотидов.

[0050] Целевые последовательности для РНК-направляемых ДНК-связывающих агентов включают как положительные, так и отрицательные цепи геномной ДНК (*m.e.* данная последовательность и обратный комплемент целевой последовательности), в качестве субстрата нуклеиновой кислоты для РНК-направляемого ДНК-связывающего агента представляет собой двухцепочечную нуклеиновую кислоту. Соответственно, когда

говорят, что направляющая последовательность является «комплементарной целевой последовательности», следует понимать, что направляющая последовательность может направлять направляющую РНК для связывания с обратным комплементом целевой последовательности. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления, где направляющая последовательность связывает обратный комплемент целевой последовательности, целевая последовательность идентична некоторым нуклеотидам целевой последовательности (например, целевой последовательности, не содержащей PAM), за исключением замены U на T в направляющей последовательности.

[0051] Применяемый в настоящем документе термин « РНК-направляемый ДНК-связывающий агент» означает полипептид или комплекс полипептидов, обладающих активностью связывания РНК и ДНК, или ДНК-связывающую субъединицу такого комплекса, где ДНК-связывающая активность специфична для последовательности и зависит от последовательности РНК. Иллюстративные РНК-направляемые ДНК-связывающие агенты включают Cas-клевазы/никазы и их инактивированные формы (ДНК-связывающие агенты dCas). Применяемый в настоящем документе термин «Cas-нуклеаза», охватывает Cas-клевазы, Cas-никазы и ДНК-связывающие агенты dCas. Cas-клевазы/никазы и ДНК-связывающие агенты dCas включают в себя комплекс Csm или Cmr системы CRISPR типа III, ее субъединицу Cas10, Csm1 или Cmr2, комплекс Cascade системы CRISPR типа I, ее субъединицу Cas3 и Cas-нуклеазы класса 2. Применяемый в настоящем документе термин «Cas-нуклеаза класса 2» представляет собой одноцепочечный полипептид с РНК-направляемой ДНК-связывающей активностью. Cas-нуклеазы класса 2 включают Cas-клевазы/никазы класса 2 (например, варианты H840A, D10A или N863A), которые дополнительно обладают РНК-направляемой клевазной или никазной активностью в отношении ДНК, и ДНК-связывающие агенты dCas класса 2, в которых активность клевазы/никазы инактивируется. Нуклеазы Cas класса 2 включают, например, белки Cas9, Cpf1, C2c1, C2c2, C2c3, HF Cas9 (например, варианты N497A, R661A, Q695A, Q926A), HypaCas9 (например, варианты N692A, M694A, Q695A, H698A), eSPCas9(1.0) (*например*, варианты K810A, K1003A, R1060A) и eSPCas9(1.1) (*например*, варианты K848A, K1003A, R1060A) и их модификации. Белок Cpf1, Zetsche et al., Cell, 163: 1-13 (2015), гомологичен Cas9 и содержит RuvC-подобный нуклеазный домен. Последовательности Cpf1 из Zetsche включены посредством ссылки во всей их полноте. *См.*, *например*, Zetsche, таблицы S1 и S3. См., *например*, Makarova et al., Nat Rev Microbiol, 13(11): 722-36 (2015); Shmakov et al., Molecular Cell, 60:385-397 (2015).

[0052] Применяемый в настоящем документе термин «редактор» относится к агенту, содержащему полипептид, способный производить модификацию в последовательности ДНК. В некоторых вариантах осуществления редактор представляет собой кливазу, такую как кливаза Cas9. В некоторых вариантах осуществления редактор способен дезаминировать основание в молекуле ДНК. В некоторых вариантах осуществления редактор способен дезаминировать цитозин (C) в ДНК. В некоторых вариантах осуществления редактор представляет собой слитый белок, содержащий РНК-

направляемую никазу, слитую с цитидиндезаминазой. В некоторых вариантах осуществления редактор представляет собой слитый белок, содержащий РНК-направляемую никазу, слитую с деаминазой APOBEC3A (A3A). В некоторых вариантах осуществления редактор содержит никазу Cas9, слитую с деаминазой APOBEC3A (A3A). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения редактор представляет собой слитый белок, содержащий РНК-направляемую никазу, слитую с цитидиндезаминазой и UGI. В некоторых вариантах осуществления в редакторе отсутствует UGI.

[0053] Применяемый в настоящем документе термин «цитидиндезаминаза» означает полипептид или комплекс полипептидов, которые способны проявлять активность цитидиндезаминазы, которая катализирует гидролитическое дезаминирование цитидина или дезоксицитидина, обычно приводящее к образованию уридина или дезоксиуридина. Цитидиндезаминазы охватывают ферменты суперсемейства цитидиндезаминаз и, в частности, ферменты семейства APOBEC (подгруппы ферментов APOBEC1, APOBEC2, APOBEC4 и APOBEC3), индуцированную активацией цитидиндезаминазу (AID или AICDA) и деаминазы CMP (см., например, Conticello et al., Mol. Biol. Evol. 22:367-77, 2005; Conticello, Genome Biol. 9:229, 2008; Muramatsu et al., J. Biol. Chem. 274: 18470-6, 1999); Carrington et al., Cells 9:1690 (2020)).

[0054] Применяемый в настоящем документе термин «APOBEC3» относится к белку APOBEC3, такому как белок APOBEC3, экспрессируемый любым из семи генов (A3A-A3H) локуса APOBEC3 человека. APOBEC3 может обладать каталитической активностью редактирования ДНК или РНК. Аминокислотная последовательность APOBEC3A была описана (идентификатор доступа UniPROT: p31941) и включена в настоящий документ как SEQ ID NO: 40. В некоторых вариантах осуществления белок APOBEC3 представляет собой белок APOBEC3 человека и/или белок дикого типа. Варианты включают белки, имеющие последовательность, которые отличаются от белка APOBEC3 дикого типа одной или несколькими мутациями (т.е. заменами, делециями, вставками), такими как одна или несколько точечных замен. Например, можно применять укороченную последовательность APOBEC3, т.е. удалением нескольких N-концевых или C-концевых аминокислот, предпочтительно от одной до четырех аминокислот на C-конце последовательности. Применяемый в настоящем документе термин «вариант» относится к аллельным вариантам, вариантам сплайсинга и природным или искусственным мутантам, которые гомологичны эталонной последовательности APOBEC3. Вариант является «функциональным» в том смысле, что он проявляет каталитическую активность в редактировании ДНК или РНК. В некоторых вариантах осуществления APOBEC3 (такой как человеческий APOBEC3A) аминокислота дикого типа имеет позицию 57 (как пронумеровано в последовательности дикого типа). В некоторых вариантах осуществления APOBEC3 (такой как человеческий APOBEC3A) аминокислота содержит аспарагин в позиции 57 (как пронумеровано в последовательности дикого типа).

[0055] Применяемый в настоящем документе термин «никаза» представляет собой фермент, который создает одноцепочечный разрыв (также известный как «разрыв») в двухцепочечной ДНК, т. е. разрезает одну цепь двойной спирали ДНК, но не другую. Применяемый в настоящем документе термин «РНК-направляемая ДНК-никаза» означает полипептид или комплекс полипептидов, обладающих ДНК-никазной активностью, где ДНК-никазная активность специфична для последовательности и зависит от последовательности РНК. Типичные ДНК-никазы, направленые РНК, включают никазы Cas. Никазы Cas включают никазные формы комплекса Csm или Cmr системы CRISPR типа III, ее субъединицы Cas10, Csm1 или Cmr2, каскадный комплекс системы CRISPR I типа, ее субъединицу Cas3 и нуклеазы Cas класса 2. Никазы Cas класса 2 включают варианты, в которых инактивирован только один из двух каталитических доменов, которые обладают РНК-направляемой ДНК-никазной активностью. Никазы Cas класса 2 включают, например, Cas9 (например, варианты SpyCas9 H840A, D10A или N863A), Cpf1, C2c1, C2c2, C2c3, HF Cas9 (например, варианты N497A, R661A, Q695A, Q926A), HypaCas9 (например, варианты N692A, M694A, Q695A, H698A), белки eSPCas9(1.0) (например, варианты K810A, K1003A, R1060A) и eSPCas9(1.1) (например, варианты K848A, K1003A, R1060A) и их модификации. Белок Cpf1, Zetsche et al., Cell, 163: 1-13 (2015), гомологичен Cas9 и содержит домен RuvC-подобного белка. Последовательности Cpf1 из Zetsche включены посредством ссылки во всей их полноте. См., например, Zetsche, таблицы S1 и S3. «Cas9» включает S. pyogenes (Spy) Cas9, варианты Cas9, перечисленные в настоящем документе, и их эквиваленты. См., например, Makarova et al., Nat Rev Microbiol, 13(11): 722-36 (2015); Shmakov et al., Molecular Cell, 60:385-397 (2015).

[0056] Применяемый в настоящем документе термин «слитый белок» относится к гибридному полипептиду, который содержит белковые домены по меньшей мере из двух разных белков. Один белок может быть расположен на аминоконцевой (N-концевой) части слитого белка или на карбоксиконцевом (С-концевом) белке, образуя таким образом «аминоконцевой слитый белок» или «карбоксиконцевой слитый белок», соответственно. Любой из предложенных в настоящем изобретении белков может быть получен любым способом, известным в данной области техники. Например, представленные в настоящем документе белки могут быть получены посредством экспрессии и очистки рекомбинантных белков, что особенно подходит для слитых белков, содержащих пептидный линкер. Методы экспрессии и очистки рекомбинантных белков хорошо известны в данной области техники и включают методы, описанные Грином и Сэмбруком, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (4th ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbour, NY (2012)), полное содержание которых включены в настоящий документ в посредством ссылки.

[0057] Применяемый в настоящем документе термин «линкер», относится к химической группе или молекуле, связывающей две соседние молекулы или фрагменты. Как правило, линкер расположен между двумя группами, молекулами или другими фрагментами или окружен ими и соединен с каждым из них ковалентной связью. В

некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой аминокислоту или множество аминокислот (например, пептид или белок), такой как линкер «XTEN» из 16 аминокислотных остатков или его вариант (см., например, Примеры; и Шелленбергер и др. Рекомбинантный полипептид продлевает период полувыведения пептидов и белков in vivo регулируемым образом. Nat. Biotechnol. 27, 1186-1190 (2009)). В некоторых вариантах осуществления линкер XTEN содержит последовательность SGSETPGTSESATPES (SEQ ID NO: 900), SGSETPGTSESA (SEQ ID NO: 901) или SGSETPGTSESATPEGGSGGS (SEQ ID NO: 902). В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой пептидный линкер, содержащий одну или несколько последовательностей, выбранных из SEQ ID NO: 903-971.

[0058] Применяемый в настоящем документе термин «ингибитор урацил-гликозилазы» или «UGI» относится к белку, который способен ингибировать фермент репарации оснований урацил-ДНК-гликозилазы (UDG).

[0059] Применяемый в настоящем документе термин «открытая рамка считывания» или «ORF» гена относится к последовательности, состоящей из серии кодонов, которые определяют аминокислотную последовательность белка, кодируемого геном. ORF начинается со стартового кодона (например, ATG в ДНК или AUG в РНК) и заканчивается стоп-кодоном, например, TAA, TAG или TGA в ДНК или UAA, UAG или UGA в РНК.

[0060] Применяемый в настоящем документе термин «рибонуклеопротеин» (РНП) или «комплекс РНП» относится к направляющей РНК вместе с РНК-направляемым ДНК-связывающим агентом, таким как Cas-нуклеаза, например, Cas-клеваза, Cas-никаза или ДНК-связывающий агент dCas. (например, Cas9). В некоторых вариантах осуществления направляющая РНК направляет РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, такой как Cas9, к целевой последовательности, а направляющая РНК гибридизируется с целевой последовательностью и связывается с ней; в случаях, когда агент представляет собой клевазу или никазу, за связыванием может следовать расщепление или разрыв.

[0061] Как применяется в данном документе, считается, что первая последовательность «содержит последовательность с по меньшей мере X% идентичности» со второй последовательностью, если выравнивание первой последовательности со второй последовательностью демонстрирует, что X% или более из положений во второй последовательности полностью соответствуют первой последовательности. Например, последовательность AAGA содержит последовательность со 100% идентичностью с последовательностью AAG, потому что выравнивание дало бы 100% идентичность в том смысле, что имеются совпадения во всех трех положениях второй последовательности. Различия между РНК и ДНК (обычно обмен уридина на тимидин или наоборот) и присутствие нуклеозидных аналогов, таких как модифицированные уридины, не способствуют различиям в идентичности или комплементарности среди полинуклеотидов поскольку соответствующие нуклеотиды (такие как тимидин, уридин или модифицированный уридин) имеют один и тот же комплемент (например, аденозин для всех из тимидина, уридина или модифицированного

уридина; другим примером являются цитозин и 5-метилцитозин, оба из которых содержат в качестве комплементарного основания гуанозин или модифицированный гуанозин). Так, например, последовательность 5'-AXG, где X представляет собой любой модифицированный уридин, такой как псевдоуридин, N1-метилпсевдоуридин или 5-метоксиуридин, считается на 100% идентичной AUG, поскольку обе они полностью комплементарны одной и той же последовательности (5'-CAU). Примерами алгоритмов выравнивания являются алгоритмы Смита-Уотермана и Нидлмана-Вунша, которые хорошо известны в данной области техники. Специалисту в данной области техники будет понятно, какой алгоритм выбрать и какие настройки параметров подходят для данной пары последовательностей, которые должны быть выровнены; для последовательностей в общем одинаковой длины и ожидаемой идентичности >50% для аминокислот или >75% для нуклеотидов, как правило, подходит алгоритм Нидлмана-Вунша со стандартными настройками интерфейса алгоритма Нидлмана-Вунша, предложенного EBI на веб-сервере www.ebi.ac.uk.

[0062] Применяемый в настоящем документе термин «мРНК» относится к полинуклеотиду, и содержит открытую рамку считывания, которая может транслироваться в полипептид (*m.e.*, может служить субстратом для трансляции с помощью рибосомы и аминоацилированной тРНК). мРНК может содержать сахарофосфатный остов, включающий остатки рибозы или их аналоги, например, остатки 2'-метоксирибозы. В некоторых вариантах осуществления сахара сахарофосфатного остова мРНК состоят по существу из остатков рибозы, остатков 2'-метоксирибозы или их комбинации.

[0063] Применяемый в данном документе термин «индел» относится к вставным/делеционным мутациям, состоящим из ряда нуклеотидов, которые либо вставлены, либо удалены, например, в месте двухцепочечных разрывов (DSB) в целевой нуклеиновой кислоте.

[0064] Применяемый в настоящем документе термин «снижение или устранение» экспрессии белка в клетке относится к частичной или полной потере экспрессии белка по сравнению с немодифицированной клеткой. В некоторых вариантах осуществления поверхностная экспрессия белка на клетке измеряется с помощью проточной цитометрии и имеет «сниженную или устраненную» поверхностную экспрессию по сравнению с немодифицированной клеткой, о чем свидетельствует снижение флуоресцентного сигнала при окрашивании тем же антителом против белка. Клетка, которая имеет «сниженную или устраненную» поверхностную экспрессию белка с помощью проточной цитометрии по сравнению с немодифицированной клеткой, может быть названа «отрицательной» в отношении экспрессии этого белка, о чем свидетельствует сигнал флуоресценции, аналогичный сигналу клетки, окрашенной изотипическим контрольным антителом. «Снижение или устранение» экспрессии белка можно измерить другими известными в данной области техники методиками с соответствующими контролями, известными специалистам в данной области техники.

[0065] Применяемый в данном документе термин «нокдаун» относится к снижению экспрессии конкретного продукта гена (например, белка, мРНК или обоих), например, по сравнению с экспрессией неотредактированной целевой последовательности. Нокдаун белка можно измерить путем определения общего клеточного количества белка в образце, таком как ткань, жидкость или клеточная популяция. Его также можно измерить путем измерения суррогата, маркера или активности белка. Способы измерения нокдауна мРНК известны и включают анализ мРНК, выделенной из представляющего интерес образца. В некоторых вариантах осуществления «нокдаун» может относиться к некоторой потере экспрессии конкретного продукта гена, например, к уменьшению количества транскрибируемой мРНК или уменьшению количества белка, экспрессируемого клеткой или популяцией клеток (включая in vivo популяции, такие как были обнаруженные в тканях).

[0066] Применяемый в настоящем документе термин «нокаут» относится к потере экспрессии определенного гена или определенного белка в клетке. Нокаут может привести к снижению экспрессии ниже уровня обнаружения анализа. Нокаут можно измерить либо путем определения общего клеточного количества белка в клетке, ткани или популяции клеток.

[0067] Используемый в данном документе термин «целевая последовательность» или «геномная целевая последовательность» относится к последовательности нуклеиновой кислоты в целевом гене, которая комплементарна направляющей последовательности нРНК. Взаимодействие целевой последовательности и направляющей последовательности направляет РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, для связывания и, возможно, разрыва или расщепления (в зависимости от активности агента) внутри целевой последовательности.

[0068] Применяемый в настоящем документе термин «лечение» относится к любому введению или применению терапевтического средства для лечения заболевания или расстройства у субъекта и включает ингибирование заболевания, остановку его развития, облегчение одного или большего количества симптомов заболевания, излечение заболевания или предотвращение одного из них или большее количество симптомов заболевания, включая рецидив симптома.

[0069] Далее будут подробно рассмотрены некоторые варианты осуществления настоящего изобретения, примеры которых проиллюстрированы на прилагаемых чертежах. Хотя изобретение описано в связи с проиллюстрированными вариантами осуществления, следует понимать, что они не предназначены для ограничения изобретения этими вариантами осуществления. Напротив, изобретение предназначено для охвата всех альтернатив, модификаций и эквивалентов, которые могут быть включены в изобретение, как определено прилагаемой формулой изобретения и включенными вариантами осуществления.

[0070] Прежде чем настоящие идеи будут описаны более подробно, следует понимать, что раскрытие не ограничивается конкретными композициями или стадиями

процессов, поскольку они могут варьироваться. Следует отметить, что при применении в данном описании и прилагаемой формуле формы единственного числа включают ссылки на множественное число, если контекст явно не указывает иное. Таким образом, например, ссылка на «конъюгат» включает множество конъюгатов, а ссылка на «клетку» включает множество клеток и тому подобное.

[0071] Числовые диапазоны включают в себя числа, определяющие диапазон. Измеряемые и измеримые значения считаются приблизительными с учетом значащих цифр и ошибки, связанной с измерением. Кроме того, применение слов «содержат», «содержит», «содержащий», «состоят из», «состоит из», «состоящий из», «включают», «включает» и «включающий» не является ограничивающим. Следует понимать, что как приведенное выше общее описание, так и приведенное ниже подробное описание являются просто иллюстративными и пояснительными и не ограничивают пункты заявленной формулы.

[0072] Если специально не указано в описании, варианты осуществления в описании, которые содержат «содержащие» различные компоненты, также рассматриваются как «состоящие из» или «состоящие по существу из» указанных компонентов; варианты осуществления в описании, которые содержат «состоящий из» различных компонентов, также рассматриваются как «содержащие» или «состоящие в основном из» указанных компонентов; и варианты осуществления в описании, в которых говорится, что «состоит в основном из» различных компонентов, также рассматриваются как «состоящие из» или «содержащие» указанные компоненты (эта взаимозаменяемость не применяется к применению этих терминов в формуле изобретения). Термин «или» применяется во всеобъемлющем смысле, *т. е.* эквивалентен «и/или», если контекст явно не указывает иное.

[0073] Заголовки разделов, используемые в данном документе, предназначены только для организационных целей и не должны рассматриваться как ограничивающие объект изобретения каким-либо образом. В случае, если какой-либо материал, включенный в качестве ссылки, противоречит любому термину, определенному в данном описании, или любому другому прямому содержанию в данном описании, это описание является превалирующим. Хотя настоящие идеи описаны в сочетании с различными вариантами осуществления, не предполагается, что настоящие идеи ограничиваются такими вариантами осуществления. Напротив, настоящие идеи охватывают различные альтернативы, модификации и эквиваленты, что будет понятно специалистам в данной области техники.

Генетически модифицированные клетки

Композици сконструированных клеток

[0074] В данном изобретении предложены композиции сконструированных клеток, в которых снижена или устранена поверхностная экспрессия MHC класса II по сравнению с немодифицированной клеткой. В некоторых вариантах осуществления композиция сконструированных клеток содержит генетическую модификацию гена CIITA. В

некоторых вариантах осуществления сконструированная клетка представляет собой аллогенную клетку. В некоторых вариантах осуществления сконструированная клетка со сниженной экспрессией MHC класса II применима для терапии на основе адоптивного переноса клеток. В некоторых вариантах осуществления сконструированная клетка содержит дополнительные генетические модификации в геноме клетки для получения клетки, подходящей для целей аллогенной трансплантации.

[0075] В некоторых вариантах осуществления предложена сконструированная клетка, в которой снижена или устранена поверхностная экспрессия MHC класса II по сравнению с немодифицированной клеткой, содержащая генетическую модификацию в гене CIITA, где модификация включает по меньшей мере один нуклеотид сайт сплайсинга в пределах геномных координат chr16:10877360-10923242. В некоторых вариантах осуществления предложена сконструированная клетка, в которой снижена или устранена поверхностная экспрессия MHC класса II по сравнению с немодифицированной клеткой, содержащая генетическую модификацию в гене CIITA, где модификация включает по меньшей мере один нуклеотид сайта сплайсинга в пределах геномных координат chr16:10902171-10923242. В некоторых вариантах осуществления генетическая модификация включает модификацию по меньшей мере одного нуклеотида акцепторного сайта сплайсинга. В некоторых вариантах осуществления генетическая модификация включает модификацию по меньшей мере одного нуклеотида акцепторного сайта сплайсинга, где один нуклеотид представляет собой аденин (A). В некоторых вариантах осуществления генетическая модификация включает модификацию по меньшей мере одного нуклеотида акцепторного сайта сплайсинга, где один нуклеотид представляет собой гуанин (G). В некоторых вариантах осуществления генетическая модификация включает модификацию по меньшей мере одного нуклеотида донорного сайта сплайсинга. В некоторых вариантах осуществления генетическая модификация включает модификацию по меньшей мере одного нуклеотида донорного сайта сплайсинга, где один нуклеотид представляет собой гуанин (G). В некоторых вариантах осуществления генетическая модификация включает модификацию по меньшей мере одного нуклеотида донорного сайта сплайсинга, где один нуклеотид представляет собой тимин (T). В некоторых вариантах осуществления генетическая модификация включает модификацию нуклеотида, граничащего с сайтом сплайсинга.

[0076] В некоторых вариантах осуществления предложена сконструированная клетка, в которой снижена или устранена поверхностная экспрессия MHC класса II по сравнению с немодифицированной клеткой, содержащая генетическую модификацию в гене CIITA, где модификация включает по меньшей мере 5 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат chr16: 10902171-10923242. В некоторых вариантах осуществления сконструированная клетка, в которой снижена или устранена поверхностная экспрессия MHC класса II по сравнению с немодифицированной клеткой, содержит генетическую модификацию гена CIITA, где модификация включает по меньшей мере 6, 7, 8, 9 или 10 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат

chr16: 10902171-10923242.

[0077] В некоторых вариантах осуществления предложена сконструированная клетка, в которой снижена или устранена поверхностная экспрессия MHC класса II по сравнению с немодифицированной клеткой, содержащая генетическую модификацию в гене CIITA, где модификация включает по меньшей мере одну замену C на T или по меньшей мере одну замену A на G в пределах геномных координат chr16: 10902171-10923242.

[0078] В некоторых вариантах осуществления предложена сконструированная клетка, в которой снижена или устранена поверхностная экспрессия MHC класса II по сравнению с немодифицированной клеткой, содержащая генетическую модификацию в гене CIITA, где модификация включает по меньшей мере один нуклеотид сайта сплайсинга в пределах геномных координат chr16:10903873-chr:10923242

[0079] В некоторых вариантах осуществления предложена сконструированная клетка, в которой снижена или устранена поверхностная экспрессия MHC класса II по сравнению с немодифицированной клеткой, содержащая генетическую модификацию в гене CIITA, где модификация включает по меньшей мере один нуклеотид сайт сплайсинга в пределах геномных координат chr:16:10906485-chr:10923242.

[0080] В некоторых вариантах осуществления предложена сконструированная клетка, в которой снижена или устранена поверхностная экспрессия MHC класса II по сравнению с немодифицированной клеткой, содержащая генетическую модификацию в гене CIITA, где модификация включает по меньшей мере один нуклеотид сайт сплайсинга в пределах геномных координат chr16:10908130-chr:10923242.

[0081] В некоторых вариантах осуществления сконструированная клетка, в которой снижена или устранена поверхностная экспрессия MHC класса II по сравнению с немодифицированной клеткой, содержит генетическую модификацию в гене CIITA, где генетическая модификация включает по меньшей мере один нуклеотид сайта сплайсинга в пределах геномных координат, выбранных из: chr16:10908132-10908152, chr16:10908131-10908151, chr16:10916456-10916476, chr16:10918504-10918524, chr16:10909022-10909042, chr16:10918512-10918532, chr16:10918511-10918531, chr16:10895742-10895762, chr16:10916362-10916382, chr16:10916455-10916475, chr16:10909172-10909192, chr16:10906492-10906512, chr16:10909006-10909026, chr16:10922478-10922498, chr16:10895747-10895767, chr16:10916348-10916368, chr16:10910186-10910206, chr16:10906481-10906501, chr16:10909007-10909027, chr16:10895410-10895430 и chr16:10908130-10908150.

[0082] В некоторых вариантах осуществления сконструированная клетка, в которой снижена или устранена поверхностная экспрессия MHC класса II по сравнению с немодифицированной клеткой, содержит генетическую модификацию в гене CIITA, где генетическая модификация включает по меньшей мере один нуклеотид сайта сплайсинга в пределах геномных координат, выбранных из: chr16:10918504-10918524, chr16:10923218-10923238, chr16:10923219-10923239, chr16:10923221-10923241, chr16:10906485-10906505,

chr16:10916359-10916379, chr16:10903873-10903893, chr16:10909172-10909192, chr16:10922153-10922173, chr16:10916450-10916470, chr16:10923222-10923242, chr16:10916449-10916469 и chr16:10923214-10923234. В некоторых вариантах осуществления сконструированная клетка, в которой снижена или устранена поверхностная экспрессия MHC класса II по сравнению с немодифицированной клеткой, содержит генетическую модификацию в гене CIITA, где генетическая модификация включает по меньшей мере один нуклеотид сайта сплайсинга в пределах геномных координат, выбранных из: chr16:10918504-10918524, chr16:10923218-10923238, chr16:10923219-10923239, chr16:10923221-10923241, chr16:10906485-10906505, chr16:10916359-10916379, chr16:10903873-10903893, chr16:10909172-10909192, chr16:10922153-10922173 и chr16:10916450-10916470.

[0083] В некоторых вариантах осуществления сконструированная клетка, в которой снижена или устранена поверхностная экспрессия MHC класса II по сравнению с немодифицированной клеткой, содержит генетическую модификацию в гене CIITA, где генетическая модификация включает по меньшей мере один нуклеотид сайта сплайсинга в пределах геномных координат, выбранных из: chr16:10908132-10908152, chr16:10908131-10908151, chr16:10916456-10916476, chr16:10918504-10918524, chr16:10909022-10909042, chr16:10918512-10918532, chr16:10918511-10918531, chr16:10895742-10895762, chr16:10916362-10916382, chr16:10916455-10916475, chr16:10909172-10909192, chr16:10906492-10906512, chr16:10909006-10909026 и chr16:10922478-10922498.

[0084] В некоторых вариантах осуществления сконструированная клетка, в которой снижена или устранена поверхностная экспрессия MHC класса II по сравнению с немодифицированной клеткой, содержит генетическую модификацию в гене CIITA, где генетическая модификация включает по меньшей мере один нуклеотид сайта сплайсинга в пределах геномных координат, выбранных из: chr16:10908132-10908152, chr16:10908131-10908151, chr16:10916456-10916476 и chr16:10918504-10918524.

[0085] В некоторых вариантах осуществления сконструированная клетка, в которой снижена или устранена поверхностная экспрессия MHC класса II по сравнению с немодифицированной клеткой, содержит генетическую модификацию в гене CIITA, где генетическая модификация включает по меньшей мере один нуклеотид сайта сплайсинга в пределах геномных координат chr16:10908132-10908152. В некоторых вариантах осуществления сконструированная клетка, в которой снижена или устранена поверхностная экспрессия MHC класса II по сравнению с немодифицированной клеткой, содержит генетическую модификацию в гене CIITA, где генетическая модификация включает по меньшей мере один нуклеотид сайта сплайсинга в пределах геномных координат chr16:10908131-10908151. В некоторых вариантах осуществления сконструированная клетка, в которой снижена или устранена поверхностная экспрессия MHC класса II по сравнению с немодифицированной клеткой, содержит генетическую модификацию в гене CIITA, где генетическая модификация включает по меньшей мере один нуклеотид сайта сплайсинга в пределах геномных координат chr16:10916456-

10916476. В некоторых вариантах осуществления сконструированная клетка, в которой снижена или устранена поверхностная экспрессия MHC класса II по сравнению с немодифицированной клеткой, содержит генетическую модификацию в гене CIITA, где генетическая модификация включает по меньшей мере один нуклеотид сайта сплайсинга в пределах геномных координат chr16:10918504-10918524.

[0086] В некоторых вариантах осуществления сконструированная клетка, в которой снижена или устранена поверхностная экспрессия MHC класса II по сравнению с немодифицированной клеткой, содержит генетическую модификацию в гене CIITA, где генетическая модификация включает по меньшей мере один нуклеотид сайта сплайсинга в пределах геномных координат, выбранных из: chr16:10918504-10918524, chr16:10923218-10923238, chr16:10923219-10923239, chr16:10923221-10923241, chr16:10906486-10906506, chr16:10906485-10906505, chr16:10903873-10903893, chr16:10909172-10909192, chr16:10918423-10918443, chr16:10916362-10916382, chr16:10916450-10916470, chr16:10922153-10922173, chr16:10923222-10923242, chr16:10910176-10910196, chr16:10895742-10895762, chr16:10916449-10916469, chr16:10923214-10923234, chr16:10906492-10906512 и chr16:10906487-10906507. В некоторых вариантах осуществления сконструированная клетка, в которой снижена или устранена поверхностная экспрессия MHC класса II по сравнению с немодифицированной клеткой, содержит генетическую модификацию в гене CIITA, где генетическая модификация включает по меньшей мере один нуклеотид сайта сплайсинга в пределах геномных координат chr16:10918504-10918524, chr16:10923218-10923238, chr16:10923219-10923239, chr16:10923221-10923241, chr16:10906486-10906506, chr16:10906485-10906505, chr16:10903873-10903893, chr16:10909172-10909192, chr16:10918423-10918443, chr16:10916362-10916382, chr16:10916450-10916470 и chr16:10922153-10922173.

[0087] В некоторых вариантах осуществления сконструированная клетка, в которой снижена или устранена поверхностная экспрессия MHC класса II по сравнению с немодифицированной клеткой, содержит генетическую модификацию в гене CIITA, где генетическая модификация включает по меньшей мере один нуклеотид сайта сплайсинга в пределах геномных координат, выбранных из: chr16:10918504-10918524, chr16:10923218-10923238 и chr16:10923219-10923239.

[0088] В некоторых вариантах осуществления сконструированная клетка, в которой снижена или устранена поверхностная экспрессия MHC класса II по сравнению с немодифицированной клеткой, содержит генетическую модификацию в гене CIITA, где генетическая модификация включает по меньшей мере один нуклеотид сайта сплайсинга в пределах геномных координат chr16:10918504-10918524. В некоторых вариантах осуществления сконструированная клетка, в которой снижена или устранена поверхностная экспрессия MHC класса II по сравнению с немодифицированной клеткой, содержит генетическую модификацию в гене CIITA, где генетическая модификация включает по меньшей мере один нуклеотид сайта сплайсинга в пределах геномных координат chr16:10923218-10923238. В некоторых вариантах осуществления

сконструированная клетка, в которой снижена или устранена поверхностная экспрессия MHC класса II по сравнению с немодифицированной клеткой, содержит генетическую модификацию в гене CIITA, где генетическая модификация включает по меньшей мере один нуклеотид сайта сплайсинга в пределах геномных координат chr16:10923219-10923239.

[0089] В некоторых вариантах осуществления сконструированная клетка, в которой снижена или устранена поверхностная экспрессия MHC класса II по сравнению с немодифицированной клеткой, содержит генетическую модификацию гена CIITA, где генетическая модификация содержит индел, замену C на T или замену A на G в пределах геномных координат, выбранных из: chr16:10895410-10895430, chr16:10898649-10898669, chr16:10898658-10898678, chr16:10902171-10902191, chr16:10902173-10902193, chr16:10902174-10902194, chr16:10902179-10902199, chr16:10902183-10902203, chr16:10902184-10902204, chr16:10902644-10902664, chr16:10902779-10902799, chr16:10902788-10902808, chr16:10902789-10902809, chr16:10902790-10902810, chr16:10902795-10902815, chr16:10902799-10902819, chr16:10903708-10903728, chr16:10903713-10903733, chr16:10903718-10903738, chr16:10903721-10903741, chr16:10903723-10903743, chr16:10903724-10903744, chr16:10903873-10903893, chr16:10903878-10903898, chr16:10903905-10903925, chr16:10903906-10903926, chr16:10904736-10904756, chr16:10904790-10904810, chr16:10904811-10904831, chr16:10906481-10906501, chr16:10906485-10906505, chr16:10906486-10906506, chr16:10906487-10906507, chr16:10906492-10906512, chr16:10908127-10908147, chr16:10908130-10908150, chr16:10908131-10908151, chr16:10908132-10908152, chr16:10908137-10908157, chr16:10908138-10908158, chr16:10908139-10908159, chr16:10909006-10909026, chr16:10909007-10909027, chr16:10909018-10909038, chr16:10909021-10909041, chr16:10909022-10909042, chr16:10909172-10909192, chr16:10910165-10910185, chr16:10910176-10910196, chr16:10910186-10910206, chr16:10915547-10915567, chr16:10915551-10915571, chr16:10915552-10915572, chr16:10915567-10915587, chr16:10916348-10916368, chr16:10916359-10916379, chr16:10916362-10916382, chr16:10916449-10916469, chr16:10916450-10916470, chr16:10916455-10916475, chr16:10916456-10916476, chr16:10918423-10918443, chr16:10918504-10918524, chr16:10918511-10918531, chr16:10918512-10918532, chr16:10918539-10918559, chr16:10922153-10922173, chr16:10922478-10922498, chr16:10922487-10922507, chr16:10922499-10922519, chr16:10923205-10923225, chr16:10923214-10923234, chr16:10923218-10923238, chr16:10923219-10923239, chr16:10923220-10923240, chr16:10923221-10923241 и chr16:10923222-10923242. В некоторых вариантах осуществления генетическая модификация содержит по меньшей мере 5 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат. В некоторых вариантах осуществления генетическая модификация включает по меньшей мере 6, 7, 8, 9 или 10 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат. В некоторых вариантах осуществления генетическая модификация включает по меньшей мере одну замену C на T

или по меньшей мере одну замену A на G в пределах геномных координат.

[0090] В некоторых вариантах осуществления сконструированная клетка, в которой снижена или устранена поверхностная экспрессия MHC класса II по сравнению с немодифицированной клеткой, содержит генетическую модификацию в гене CIITA, где генетическая модификация включает индел, замену C на T или замену A на G в пределах геномных координат, выбранных из: chr16:10908132-10908152, chr16:10908131-10908151, chr16:10916456-10916476, chr16:10918504-10918524, chr16:10909022-10909042, chr16:10918512-10918532, chr16:10918511-10918531, chr16:10895742-10895762, chr16:10916362-10916382, chr16:10916455-10916475, chr16:10909172-10909192, chr16:10906492-10906512, chr16:10909006-10909026, chr16:10922478-10922498, chr16:10895747-10895767, chr16:10916348-10916368, chr16:10910186-10910206, chr16:10906481-10906501, chr16:10909007-10909027, chr16:10895410-10895430 и chr16:10908130-10908150. В некоторых вариантах осуществления генетическая модификация содержит по меньшей мере 5 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат. В некоторых вариантах осуществления генетическая модификация включает по меньшей мере 6, 7, 8, 9 или 10 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат. В некоторых вариантах осуществления генетическая модификация включает по меньшей мере одну замену C на T или по меньшей мере одну замену A на G в пределах геномных координат.

[0091] В некоторых вариантах осуществления сконструированная клетка, в которой снижена или устранена поверхностная экспрессия MHC класса II по сравнению с немодифицированной клеткой, содержит генетическую модификацию в гене CIITA, где генетическая модификация включает индел, замену C на T или замену A на G в пределах геномных координат, выбранных из: chr16:10918504-10918524, chr16:10923218-10923238, chr16:10923219-10923239, chr16:10923221-10923241, chr16:10906485-10906505, chr16:10916359-10916379, chr16:10903873-10903893, chr16:10909172-10909192, chr16:10922153-10922173, chr16:10916450-10916470, chr16:10923222-10923242, chr16:10916449-10916469 и chr16:10923214-10923234. В некоторых вариантах осуществления сконструированная клетка, в которой снижена или устранена поверхностная экспрессия MHC класса II по сравнению с немодифицированной клеткой, содержит генетическую модификацию в гене CIITA, где генетическая модификация включает индел, замену C на T или замену A на G в пределах геномных координат, выбранных из: chr16:10918504-10918524, chr16:10923218-10923238, chr16:10923219-10923239, chr16:10923221-10923241, chr16:10906485-10906505, chr16:10916359-10916379, chr16:10903873-10903893, chr16:10909172-10909192, chr16:10922153-10922173 и chr16:10916450-10916470. В некоторых вариантах осуществления генетическая модификация содержит по меньшей мере 5 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат. В некоторых вариантах осуществления генетическая модификация включает по меньшей мере 6, 7, 8, 9 или 10 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат. В некоторых вариантах осуществления генетическая модификация включает по меньшей

мере одну замену C на T или по меньшей мере одну замену A на G в пределах геномных координат.

[0092] В некоторых вариантах осуществления сконструированная клетка, в которой снижена или устранена поверхностная экспрессия MHC класса II по сравнению с немодифицированной клеткой, содержит генетическую модификацию в гене CIITA, где генетическая модификация включает индел, замену C на T или замену A на G в пределах геномных координат, выбранных из: chr16:10908132-10908152, chr16:10908131-10908151, chr16:10916456-10916476, chr16:10918504-10918524, chr16:10909022-10909042, chr16:10918512-10918532, chr16:10918511-10918531, chr16:10895742-10895762, chr16:10916362-10916382, chr16:10916455-10916475, chr16:10909172-10909192, chr16:10906492-10906512, chr16:10909006-10909026 и chr16:10922478-10922498. В некоторых вариантах осуществления генетическая модификация содержит по меньшей мере 5 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат. В некоторых вариантах осуществления генетическая модификация включает по меньшей мере 6, 7, 8, 9 или 10 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат. В некоторых вариантах осуществления генетическая модификация включает по меньшей мере одну замену C на T или по меньшей мере одну замену A на G в пределах геномных координат.

[0093] В некоторых вариантах осуществления сконструированная клетка, в которой снижена или устранена поверхностная экспрессия MHC класса II по сравнению с немодифицированной клеткой, содержит генетическую модификацию в гене CIITA, где генетическая модификация включает индел, замену C на T или замену A на G в пределах геномных координат, выбранных из: chr16:10908132-10908152, chr16:10908131-10908151, chr16:10916456-10916476 и chr16:10918504-10918524.

[0094] В некоторых вариантах осуществления сконструированная клетка, в которой снижена или устранена поверхностная экспрессия MHC класса II по сравнению с немодифицированной клеткой, содержит генетическую модификацию в гене CIITA, где генетическая модификация включает индел, замену C на T или замену A на G в пределах геномных координат chr16:10908132-10908152. В некоторых вариантах осуществления сконструированная клетка, в которой снижена или устранена поверхностная экспрессия MHC класса II по сравнению с немодифицированной клеткой, содержит генетическую модификацию в гене CIITA, где генетическая модификация включает индел, замену C на T или замену A на G в пределах геномных координат chr16:10908131-10908151. В некоторых вариантах осуществления сконструированная клетка, в которой снижена или устранена поверхностная экспрессия MHC класса II по сравнению с немодифицированной клеткой, содержит генетическую модификацию в гене CIITA, где генетическая модификация включает индел, замену C на T или замену A на G в пределах геномных координат chr16:10916456-10916476. В некоторых вариантах осуществления сконструированная клетка, в которой снижена или устранена поверхностная экспрессия MHC класса II по сравнению с немодифицированной клеткой, содержит генетическую модификацию в гене CIITA, где генетическая модификация включает индел, замену C на

T или замену A на G в пределах геномных координат chr16:10918504-10918524. В некоторых вариантах осуществления генетическая модификация содержит по меньшей мере 5 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат. В некоторых вариантах осуществления генетическая модификация включает по меньшей мере 6, 7, 8, 9 или 10 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат. В некоторых вариантах осуществления генетическая модификация включает по меньшей мере одну замену C на T или по меньшей мере одну замену A на G в пределах геномных координат.

[0095] В некоторых вариантах осуществления сконструированная клетка, в которой снижена или устранена поверхностная экспрессия MHC класса II по сравнению с немодифицированной клеткой, содержит генетическую модификацию в гене CIITA, где генетическая модификация включает индел, замену C на T или замену A на G в пределах геномных координат, выбранных из: chr16:10918504-10918524, chr16:10923218-10923238, chr16:10923219-10923239, chr16:10923221-10923241, chr16:10906486-10906506, chr16:10906485-10906505, chr16:10903873-10903893, chr16:10909172-10909192, chr16:10918423-10918443, chr16:10916362-10916382, chr16:10916450-10916470, chr16:10922153-10922173, chr16:10923222-10923242, chr16:10910176-10910196, chr16:10895742-10895762, chr16:10916449-10916469, chr16:10923214-10923234, chr16:10906492-10906512 и chr16:10906487-10906507. В некоторых вариантах осуществления генетическая модификация содержит по меньшей мере 5 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат. В некоторых вариантах осуществления генетическая модификация включает по меньшей мере 6, 7, 8, 9 или 10 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат. В некоторых вариантах осуществления генетическая модификация включает по меньшей мере одну замену C на T или по меньшей мере одну замену A на G в пределах геномных координат.

[0096] В некоторых вариантах осуществления сконструированная клетка, в которой снижена или устранена поверхностная экспрессия MHC класса II по сравнению с немодифицированной клеткой, содержит генетическую модификацию в гене CIITA, где генетическая модификация включает индел, замену C на T или замену A на G в пределах геномных координат, выбранных из: chr16:10918504-10918524, chr16:10923218-10923238, chr16:10923219-10923239, chr16:10923221-10923241, chr16:10906486-10906506, chr16:10906485-10906505, chr16:10903873-10903893, chr16:10909172-10909192, chr16:10918423-10918443, chr16:10916362-10916382, chr16:10916450-10916470 и chr16:10922153-10922173. В некоторых вариантах осуществления генетическая модификация содержит по меньшей мере 5 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат. В некоторых вариантах осуществления генетическая модификация включает по меньшей мере 6, 7, 8, 9 или 10 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат. В некоторых вариантах осуществления генетическая модификация включает по меньшей мере одну замену C на T или по меньшей мере одну замену A на G в пределах геномных координат.

[0097] В некоторых вариантах осуществления сконструированная клетка, в которой

снижена или устранена поверхностная экспрессия MHC класса II по сравнению с немодифицированной клеткой, содержит генетическую модификацию в гене CIITA, где генетическая модификация включает индел, замену C на T или замену A на G в пределах геномных координат, выбранных из: chr16:10918504-10918524, chr16:10923218-10923238 и chr16:10923219-10923239.

[0098] В некоторых вариантах осуществления сконструированная клетка, в которой снижена или устранена поверхностная экспрессия MHC класса II по сравнению с немодифицированной клеткой, содержит генетическую модификацию в гене CIITA, где генетическая модификация включает индел, замену C на T или замену A на G в пределах геномных координат chr16:10918504-10918524. В некоторых вариантах осуществления сконструированная клетка, в которой снижена или устранена поверхностная экспрессия MHC класса II по сравнению с немодифицированной клеткой, содержит генетическую модификацию в гене CIITA, где генетическая модификация включает индел, замену C на T или замену A на G в пределах геномных координат chr16:10923218-10923238. В некоторых вариантах осуществления сконструированная клетка, в которой снижена или устранена поверхностная экспрессия MHC класса II по сравнению с немодифицированной клеткой, содержит генетическую модификацию в гене CIITA, где генетическая модификация включает индел, замену C на T или замену A на G в пределах геномных координат chr16:10923219-10923239. В некоторых вариантах осуществления генетическая модификация содержит по меньшей мере 5 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат. В некоторых вариантах осуществления генетическая модификация включает по меньшей мере 6, 7, 8, 9 или 10 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат. В некоторых вариантах осуществления генетическая модификация включает по меньшей мере одну замену C на T или по меньшей мере одну замену A на G в пределах геномных координат.

[0099] В некоторых вариантах осуществления предложена сконструированная клетка, в которой снижена или устранена поверхностная экспрессия MHC класса II с помощью системы редактирования генов, которая связывается с геномной целевой последовательностью CIITA, содержащей по меньшей мере 10 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат, выбранных из: chr16:10895410-10895430, chr16:10898649-10898669, chr16:10898658-10898678, chr16:10902171-10902191, chr16:10902173-10902193, chr16:10902174-10902194, chr16:10902179-10902199, chr16:10902183-10902203, chr16:10902184-10902204, chr16:10902644-10902664, chr16:10902779-10902799, chr16:10902788-10902808, chr16:10902789-10902809, chr16:10902790-10902810, chr16:10902795-10902815, chr16:10902799-10902819, chr16:10903708-10903728, chr16:10903713-10903733, chr16:10903718-10903738, chr16:10903721-10903741, chr16:10903723-10903743, chr16:10903724-10903744, chr16:10903873-10903893, chr16:10903878-10903898, chr16:10903905-10903925, chr16:10903906-10903926, chr16:10904736-10904756, chr16:10904790-10904810, chr16:10904811-10904831, chr16:10906481-10906501, chr16:10906485-10906505, chr16:10906486-10906506,

chr16:10906487-10906507, chr16:10906492-10906512, chr16:10908127-10908147, chr16:10908130-10908150, chr16:10908131-10908151, chr16:10908132-10908152, chr16:10908137-10908157, chr16:10908138-10908158, chr16:10908139-10908159, chr16:10909006-10909026, chr16:10909007-10909027, chr16:10909018-10909038, chr16:10909021-10909041, chr16:10909022-10909042, chr16:10909172-10909192, chr16:10910165-10910185, chr16:10910176-10910196, chr16:10910186-10910206, chr16:10915547-10915567, chr16:10915551-10915571, chr16:10915552-10915572, chr16:10915567-10915587, chr16:10916348-10916368, chr16:10916359-10916379, chr16:10916362-10916382, chr16:10916449-10916469, chr16:10916450-10916470, chr16:10916455-10916475, chr16:10916456-10916476, chr16:10918423-10918443, chr16:10918504-10918524, chr16:10918511-10918531, chr16:10918512-10918532, chr16:10918539-10918559, chr16:10922153-10922173, chr16:10922478-10922498, chr16:10922487-10922507, chr16:10922499-10922519, chr16:10923205-10923225, chr16:10923214-10923234, chr16:10923218-10923238, chr16:10923219-10923239, chr16:10923220-10923240, chr16:10923221-10923241 и chr16:10923222-10923242. В некоторых вариантах осуществления предложена сконструированная клетка, в которой снижена или устранена поверхностная экспрессия MHC класса II с помощью системы редактирования генов, которая связывается с геномной целевой последовательностью CIITA, содержащей по меньшей мере 5 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат, выбранных из: chr16:10895410-10895430, chr16:10898649-10898669, chr16:10898658-10898678, chr16:10902171-10902191, chr16:10902173-10902193, chr16:10902174-10902194, chr16:10902179-10902199, chr16:10902183-10902203, chr16:10902184-10902204, chr16:10902644-10902664, chr16:10902779-10902799, chr16:10902788-10902808, chr16:10902789-10902809, chr16:10902790-10902810, chr16:10902795-10902815, chr16:10902799-10902819, chr16:10903708-10903728, chr16:10903713-10903733, chr16:10903718-10903738, chr16:10903721-10903741, chr16:10903723-10903743, chr16:10903724-10903744, chr16:10903873-10903893, chr16:10903878-10903898, chr16:10903905-10903925, chr16:10903906-10903926, chr16:10904736-10904756, chr16:10904790-10904810, chr16:10904811-10904831, chr16:10906481-10906501, chr16:10906485-10906505, chr16:10906486-10906506, chr16:10906487-10906507, chr16:10906492-10906512, chr16:10908127-10908147, chr16:10908130-10908150, chr16:10908131-10908151, chr16:10908132-10908152, chr16:10908137-10908157, chr16:10908138-10908158, chr16:10908139-10908159, chr16:10909006-10909026, chr16:10909007-10909027, chr16:10909018-10909038, chr16:10909021-10909041, chr16:10909022-10909042, chr16:10909172-10909192, chr16:10910165-10910185, chr16:10910176-10910196, chr16:10910186-10910206, chr16:10915547-10915567, chr16:10915551-10915571, chr16:10915552-10915572, chr16:10915567-10915587, chr16:10916348-10916368, chr16:10916359-10916379, chr16:10916362-10916382, chr16:10916449-10916469, chr16:10916450-10916470, chr16:10916455-10916475, chr16:10916456-10916476, chr16:10918423-10918443,

chr16:10918504-10918524, chr16:10918511-10918531, chr16:10918512-10918532, chr16:10918539-10918559, chr16:10922153-10922173, chr16:10922478-10922498, chr16:10922487-10922507, chr16:10922499-10922519, chr16:10923205-10923225, chr16:10923214-10923234, chr16:10923218-10923238, chr16:10923219-10923239, chr16:10923220-10923240, chr16:10923221-10923241 и chr16:10923222-10923242. В некоторых вариантах осуществления геномная целевая последовательность CIITA содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат. В некоторых вариантах осуществления система редактирования генов содержит РНК-направляемый ДНК-связывающий агент. В некоторых вариантах осуществления РНК-направляемый ДНК-связывающий агент содержит белок Cas9, такой как Cas9 S. pyogenes.

[00100] В некоторых вариантах осуществления предложена сконструированная клетка, в которой снижена или устранена поверхностная экспрессия MHC класса II с помощью системы редактирования генов, которая связывается с геномной целевой последовательностью CIITA, содержащей по меньшей мере 10 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат, выбранных из: chr16:10903873-10903893, chr16:10903878-10903898, chr16:10903905-10903925, chr16:10903906-10903926, chr16:10904736-10904756, chr16:10904790-10904810, chr16:10904811-10904831, chr16:10906481-10906501, chr16:10906485-10906505, chr16:10906486-10906506, chr16:10906487-10906507, chr16:10906492-10906512, chr16:10908127-10908147, chr16:10908130-10908150, chr16:10908131-10908151, chr16:10908132-10908152, chr16:10908137-10908157, chr16:10908138-10908158, chr16:10908139-10908159, chr16:10909006-10909026, chr16:10909007-10909027, chr16:10909018-10909038, chr16:10909021-10909041, chr16:10909022-10909042, chr16:10909172-10909192, chr16:10910165-10910185, chr16:10910176-10910196, chr16:10910186-10910206, chr16:10915547-10915567, chr16:10915551-10915571, chr16:10915552-10915572, chr16:10915567-10915587, chr16:10916348-10916368, chr16:10916359-10916379, chr16:10916362-10916382, chr16:10916449-10916469, chr16:10916450-10916470, chr16:10916455-10916475, chr16:10916456-10916476, chr16:10918423-10918443, chr16:10918504-10918524, chr16:10918511-10918531, chr16:10918512-10918532, chr16:10918539-10918559, chr16:10922153-10922173, chr16:10922478-10922498, chr16:10922487-10922507, chr16:10922499-10922519, chr16:10923205-10923225, chr16:10923214-10923234, chr16:10923218-10923238, chr16:10923219-10923239, chr16:10923220-10923240, chr16:10923221-10923241 и chr16:10923222-10923242. В некоторых вариантах осуществления предложена сконструированная клетка, в которой снижена или устранена поверхностная экспрессия MHC класса II с помощью системы редактирования генов, которая связывается с геномной целевой последовательностью CIITA, содержащей по меньшей мере 5 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат, выбранных из: chr16:10903873-10903893, chr16:10903878-10903898, chr16:10903905-10903925, chr16:10903906-10903926, chr16:10904736-10904756, chr16:10904790-10904810, chr16:10904811-10904831, chr16:10906481-10906501, chr16:10906485-10906505,

chr16:10906486-10906506, chr16:10906487-10906507, chr16:10906492-10906512, chr16:10908127-10908147, chr16:10908130-10908150, chr16:10908131-10908151, chr16:10908132-10908152, chr16:10908137-10908157, chr16:10908138-10908158, chr16:10908139-10908159, chr16:10909006-10909026, chr16:10909007-10909027, chr16:10909018-10909038, chr16:10909021-10909041, chr16:10909022-10909042, chr16:10909172-10909192, chr16:10910165-10910185, chr16:10910176-10910196, chr16:10910186-10910206, chr16:10915547-10915567, chr16:10915551-10915571, chr16:10915552-10915572, chr16:10915567-10915587, chr16:10916348-10916368, chr16:10916359-10916379, chr16:10916362-10916382, chr16:10916449-10916469, chr16:10916450-10916470, chr16:10916455-10916475, chr16:10916456-10916476, chr16:10918423-10918443, chr16:10918504-10918524, chr16:10918511-10918531, chr16:10918512-10918532, chr16:10918539-10918559, chr16:10922153-10922173, chr16:10922478-10922498, chr16:10922487-10922507, chr16:10922499-10922519, chr16:10923205-10923225, chr16:10923214-10923234, chr16:10923218-10923238, chr16:10923219-10923239, chr16:10923220-10923240, chr16:10923221-10923241 и chr16:10923222-10923242. В некоторых вариантах осуществления геномная целевая последовательность CIITA содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат. В некоторых вариантах осуществления система редактирования генов содержит РНК-направляемый ДНК-связывающий агент. В некоторых вариантах осуществления РНК-направляемый ДНК-связывающий агент содержит белок Cas9, такой как Cas9 S. pyogenes.

[00101] В некоторых вариантах осуществления предложена сконструированная клетка, в которой снижена или устранена поверхностная экспрессия MHC класса II с помощью системы редактирования генов, которая связывается с геномной целевой последовательностью CIITA, содержащей по меньшей мере 10 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат, выбранных из: chr16:10906485-10906505, chr16:10906486-10906506, chr16:10906487-10906507, chr16:10906492-10906512, chr16:10908127-10908147, chr16:10908130-10908150, chr16:10908131-10908151, chr16:10908132-10908152, chr16:10908137-10908157, chr16:10908138-10908158, chr16:10908139-10908159, chr16:10909006-10909026, chr16:10909007-10909027, chr16:10909018-10909038, chr16:10909021-10909041, chr16:10909022-10909042, chr16:10909172-10909192, chr16:10910165-10910185, chr16:10910176-10910196, chr16:10910186-10910206, chr16:10915547-10915567, chr16:10915551-10915571, chr16:10915552-10915572, chr16:10915567-10915587, chr16:10916348-10916368, chr16:10916359-10916379, chr16:10916362-10916382, chr16:10916449-10916469, chr16:10916450-10916470, chr16:10916455-10916475, chr16:10916456-10916476, chr16:10918423-10918443, chr16:10918504-10918524, chr16:10918511-10918531, chr16:10918512-10918532, chr16:10918539-10918559, chr16:10922153-10922173, chr16:10922478-10922498, chr16:10922487-10922507, chr16:10922499-10922519, chr16:10923205-10923225, chr16:10923214-10923234, chr16:10923218-10923238, chr16:10923219-10923239,

chr16:10923220-10923240, chr16:10923221-10923241 и chr16:10923222-10923242. В некоторых вариантах осуществления предложена сконструированная клетка, в которой снижена или устранена поверхностная экспрессия MHC класса II с помощью системы редактирования генов, которая связывается с геномной целевой последовательностью CIITA, содержащей по меньшей мере 5 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат, выбранных из: chr16:10906485-10906505, chr16:10906486-10906506, chr16:10906487-10906507, chr16:10906492-10906512, chr16:10908127-10908147, chr16:10908130-10908150, chr16:10908131-10908151, chr16:10908132-10908152, chr16:10908137-10908157, chr16:10908138-10908158, chr16:10908139-10908159, chr16:10909006-10909026, chr16:10909007-10909027, chr16:10909018-10909038, chr16:10909021-10909041, chr16:10909022-10909042, chr16:10909172-10909192, chr16:10910165-10910185, chr16:10910176-10910196, chr16:10910186-10910206, chr16:10915547-10915567, chr16:10915551-10915571, chr16:10915552-10915572, chr16:10915567-10915587, chr16:10916348-10916368, chr16:10916359-10916379, chr16:10916362-10916382, chr16:10916449-10916469, chr16:10916450-10916470, chr16:10916455-10916475, chr16:10916456-10916476, chr16:10918423-10918443, chr16:10918504-10918524, chr16:10918511-10918531, chr16:10918512-10918532, chr16:10918539-10918559, chr16:10922153-10922173, chr16:10922478-10922498, chr16:10922487-10922507, chr16:10922499-10922519, chr16:10923205-10923225, chr16:10923214-10923234, chr16:10923218-10923238, chr16:10923219-10923239, chr16:10923220-10923240, chr16:10923221-10923241 и chr16:10923222-10923242. В некоторых вариантах осуществления геномная целевая последовательность CIITA содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат. В некоторых вариантах осуществления система редактирования генов содержит РНК-направляемый ДНК-связывающий агент. В некоторых вариантах осуществления РНК-направляемый ДНК-связывающий агент содержит белок Cas9, такой как Cas9 S. pyogenes.

[00102] В некоторых вариантах осуществления предложена сконструированная клетка, в которой снижена или устранена поверхностная экспрессия MHC класса II с помощью системы редактирования генов, которая связывается с геномной целевой последовательностью CIITA, содержащей по меньшей мере 10 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат, выбранных из: chr16:10908130-10908150, chr16:10908131-10908151, chr16:10908132-10908152, chr16:10908137-10908157, chr16:10908138-10908158, chr16:10908139-10908159, chr16:10909006-10909026, chr16:10909007-10909027, chr16:10909018-10909038, chr16:10909021-10909041, chr16:10909022-10909042, chr16:10909172-10909192, chr16:10910165-10910185, chr16:10910176-10910196, chr16:10910186-10910206, chr16:10915547-10915567, chr16:10915551-10915571, chr16:10915552-10915572, chr16:10915567-10915587, chr16:10916348-10916368, chr16:10916359-10916379, chr16:10916362-10916382, chr16:10916449-10916469, chr16:10916450-10916470, chr16:10916455-10916475, chr16:10916456-10916476, chr16:10918423-10918443, chr16:10918504-10918524, chr16:10918511-10918531,

chr16:10918512-10918532, chr16:10918539-10918559, chr16:10922153-10922173, chr16:10922478-10922498, chr16:10922487-10922507, chr16:10922499-10922519, chr16:10923205-10923225, chr16:10923214-10923234, chr16:10923218-10923238, chr16:10923219-10923239, chr16:10923220-10923240, chr16:10923221-10923241 и chr16:10923222-10923242. В некоторых вариантах осуществления предложена сконструированная клетка, в которой снижена или устранена поверхностная экспрессия MHC класса II с помощью системы редактирования генов, которая связывается с геномной целевой последовательностью CIITA, содержащей по меньшей мере 5 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат, выбранных из: chr16:10908130-10908150, chr16:10908131-10908151, chr16:10908132-10908152, chr16:10908137-10908157, chr16:10908138-10908158, chr16:10908139-10908159, chr16:10909006-10909026, chr16:10909007-10909027, chr16:10909018-10909038, chr16:10909021-10909041, chr16:10909022-10909042, chr16:10909172-10909192, chr16:10910165-10910185, chr16:10910176-10910196, chr16:10910186-10910206, chr16:10915547-10915567, chr16:10915551-10915571, chr16:10915552-10915572, chr16:10915567-10915587, chr16:10916348-10916368, chr16:10916359-10916379, chr16:10916362-10916382, chr16:10916449-10916469, chr16:10916450-10916470, chr16:10916455-10916475, chr16:10916456-10916476, chr16:10918423-10918443, chr16:10918504-10918524, chr16:10918511-10918531, chr16:10918512-10918532, chr16:10918539-10918559, chr16:10922153-10922173, chr16:10922478-10922498, chr16:10922487-10922507, chr16:10922499-10922519, chr16:10923205-10923225, chr16:10923214-10923234, chr16:10923218-10923238, chr16:10923219-10923239, chr16:10923220-10923240, chr16:10923221-10923241 и chr16:10923222-10923242. В некоторых вариантах осуществления геномная целевая последовательность CIITA содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат. В некоторых вариантах осуществления система редактирования генов содержит РНК-направляемый ДНК-связывающий агент. В некоторых вариантах осуществления РНК-направляемый ДНК-связывающий агент содержит белок Cas9, такой как Cas9 S. pyogenes.

[00103] В некоторых вариантах осуществления предложена сконструированная клетка, в которой снижена или устранена поверхностная экспрессия MHC класса II с помощью системы редактирования генов, которая связывается с геномной целевой последовательностью CIITA, содержащей по меньшей мере 5 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат, выбранных из: chr16:10908132-10908152, chr16:10908131-10908151, chr16:10916456-10916476, chr16:10918504-10918524, chr16:10909022-10909042, chr16:10918512-10918532, chr16:10918511-10918531, chr16:10895742-10895762, chr16:10916362-10916382, chr16:10916455-10916475, chr16:10909172-10909192, chr16:10906492-10906512, chr16:10909006-10909026, chr16:10922478-10922498, chr16:10895747-10895767, chr16:10916348-10916368, chr16:10910186-10910206, chr16:10906481-10906501, chr16:10909007-10909027, chr16:10895410-10895430 и chr16:10908130-10908150. В некоторых вариантах осуществления геномная целевая

последовательность CIITA содержит по меньшей мере 10 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат. В некоторых вариантах осуществления геномная целевая последовательность CIITA содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат. В некоторых вариантах осуществления система редактирования генов содержит РНК-направляемый ДНК-связывающий агент. В некоторых вариантах осуществления РНК-направляемый ДНК-связывающий агент содержит белок Cas9, такой как Cas9 S. pyogenes.

[00104] В некоторых вариантах осуществления предложена сконструированная клетка, в которой снижена или устранена поверхностная экспрессия MHC класса II с помощью системы редактирования генов, которая связывается с геномной целевой последовательностью CIITA, содержащей по меньшей мере 5 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат, выбранных из: chr16:10918504-10918524, chr16:10923218-10923238, chr16:10923219-10923239, chr16:10923221-10923241, chr16:10906485-10906505, chr16:10916359-10916379, chr16:10903873-10903893, chr16:10909172-10909192, chr16:10922153-10922173, chr16:10916450-10916470, chr16:10923222-10923242, chr16:10916449-10916469 и chr16:10923214-10923234. В некоторых вариантах осуществления предложена сконструированная клетка, в которой снижена или устранена поверхностная экспрессия MHC класса II с помощью системы редактирования генов, которая связывается с геномной целевой последовательностью CIITA, содержащей по меньшей мере 5 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат, выбранных из: chr16:10918504-10918524, chr16:10923218-10923238, chr16:10923219-10923239, chr16:10923221-10923241, chr16:10906485-10906505, chr16:10916359-10916379, chr16:10903873-10903893, chr16:10909172-10909192, chr16:10922153-10922173 и chr16:10916450-10916470. В некоторых вариантах осуществления геномная целевая последовательность CIITA содержит по меньшей мере 10 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат. В некоторых вариантах осуществления геномная целевая последовательность CIITA содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат. В некоторых вариантах осуществления система редактирования генов содержит РНК-направляемый ДНК-связывающий агент. В некоторых вариантах осуществления РНК-направляемый ДНК-связывающий агент содержит белок Cas9, такой как Cas9 S. pyogenes.

[00105] В некоторых вариантах осуществления предложена сконструированная клетка, в которой снижена или устранена поверхностная экспрессия MHC класса II с помощью системы редактирования генов, которая связывается с геномной целевой последовательностью CIITA, содержащей по меньшей мере 5 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат, выбранных из: chr16:10908132-10908152, chr16:10908131-10908151, chr16:10916456-10916476, chr16:10918504-10918524, chr16:10909022-10909042, chr16:10918512-10918532, chr16:10918511-10918531, chr16:10895742-10895762, chr16:10916362-10916382, chr16:10916455-10916475, chr16:10909172-10909192, chr16:10906492-10906512, chr16:10909006-10909026 и chr16:10922478-10922498. В

некоторых вариантах осуществления геномная целевая последовательность CIITA содержит по меньшей мере 10 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат. В некоторых вариантах осуществления геномная целевая последовательность CIITA содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат. В некоторых вариантах осуществления система редактирования генов содержит РНК-направляемый ДНК-связывающий агент. В некоторых вариантах осуществления РНК-направляемый ДНК-связывающий агент содержит белок Cas9, такой как Cas9 S. pyogenes.

[00106] В некоторых вариантах осуществления предложена сконструированная клетка, в которой снижена или устранена поверхностная экспрессия MHC класса II с помощью системы редактирования генов, которая связывается с геномной целевой последовательностью CIITA, содержащей по меньшей мере 5 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат, выбранных из: chr16:10908132-10908152, chr16:10908131-10908151, chr16:10916456-10916476 и chr16:10918504-10918524. В некоторых вариантах осуществления предложена сконструированная клетка, в которой снижена или устранена поверхностная экспрессия MHC класса II с помощью системы редактирования генов, которая связывается с геномной цеелвой последовательностью CIITA, содержащей по меньшей мере 5 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат chr16:10908132-10908152. В некоторых вариантах осуществления предложена сконструированная клетка, в которой снижена или устранена поверхностная экспрессия MHC класса II с помощью системы редактирования генов, которая связывается с геномной цеелвой последовательностью CIITA, содержащей по меньшей мере 5 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат chr16:10908131-10908151. В некоторых вариантах осуществления предложена сконструированная клетка, в которой снижена или устранена поверхностная экспрессия MHC класса II с помощью системы редактирования генов, которая связывается с геномной цеелвой последовательностью CIITA, содержащей по меньшей мере 5 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат chr16:10916456-10916476. В некоторых вариантах осуществления предложена сконструированная клетка, в которой снижена или устранена поверхностная экспрессия MHC класса II с помощью системы редактирования генов, которая связывается с геномной цеелвой последовательностью CIITA, содержащей по меньшей мере 5 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат chr16:10918504-10918524. В некоторых вариантах осуществления геномная целевая последовательность CIITA содержит по меньшей мере 10 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат. В некоторых вариантах осуществления геномная целевая последовательность CIITA содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат. В некоторых вариантах осуществления система редактирования генов содержит РНК-направляемый ДНК-связывающий агент. В некоторых вариантах осуществления РНК-направляемый ДНК-связывающий агент содержит белок Cas9, такой как Cas9 S. pyogenes.

[00107] В некоторых вариантах осуществления предложена сконструированная клетка, в которой снижена или устранена поверхностная экспрессия MHC класса II с

помощью системы редактирования генов, которая связывается с геномной целевой последовательностью CIITA, содержащей по меньшей мере 5 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат, выбранных из: chr16:10918504-10918524, chr16:10923218-10923238, chr16:10923219-10923239, chr16:10923221-10923241, chr16:10906486-10906506, chr16:10906485-10906505, chr16:10903873-10903893, chr16:10909172-10909192, chr16:10918423-10918443, chr16:10916362-10916382, chr16:10916450-10916470, chr16:10922153-10922173, chr16:10923222-10923242, chr16:10910176-10910196, chr16:10895742-10895762, chr16:10916449-10916469, chr16:10923214-10923234, chr16:10906492-10906512 и chr16:10906487-10906507. В некоторых вариантах осуществления геномная целевая последовательность CIITA содержит по меньшей мере 10 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат. В некоторых вариантах осуществления геномная целевая последовательность CIITA содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат. В некоторых вариантах осуществления система редактирования генов содержит РНК-направляемый ДНК-связывающий агент. В некоторых вариантах осуществления РНК-направляемый ДНК-связывающий агент содержит дезаминазу. В некоторых вариантах осуществления РНК-направляемый ДНК-связывающий агент содержит дезаминазу и РНК-направляемую никазу. В некоторых вариантах осуществления деаминаза представляет собой дезаминазу APOBEC3, такую как APOBEC3A (A3A).

[00108] В некоторых вариантах осуществления предложена сконструированная клетка, в которой снижена или устранена поверхностная экспрессия MHC класса II с помощью системы редактирования генов, которая связывается с геномной целевой последовательностью CIITA, содержащей по меньшей мере 5 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат, выбранных из: chr16:10918504-10918524, chr16:10923218-10923238, chr16:10923219-10923239, chr16:10923221-10923241, chr16:10906486-10906506, chr16:10906485-10906505, chr16:10903873-10903893, chr16:10909172-10909192, chr16:10918423-10918443, chr16:10916362-10916382, chr16:10916450-10916470 и chr16:10922153-10922173. В некоторых вариантах осуществления геномная целевая последовательность CIITA содержит по меньшей мере 10 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат. В некоторых вариантах осуществления геномная целевая последовательность CIITA содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат. В некоторых вариантах осуществления система редактирования генов содержит РНК-направляемый ДНК-связывающий агент. В некоторых вариантах осуществления РНК-направляемый ДНК-связывающий агент содержит дезаминазу. В некоторых вариантах осуществления РНК-направляемый ДНК-связывающий агент содержит дезаминазу и РНК-направляемую никазу. В некоторых вариантах осуществления деаминаза представляет собой дезаминазу APOBEC3, такую как APOBEC3A (A3A).

[00109] В некоторых вариантах осуществления предложена сконструированная клетка, в которой снижена или устранена поверхностная экспрессия MHC класса II с

помощью системы редактирования генов, которая связывается с геномной целевой последовательностью CIITA, содержащей по меньшей мере 5 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат, выбранных из: chr16:10918504-10918524, chr16:10923218-10923238 и chr16:10923219-10923239. В некоторых вариантах осуществления геномная целевая последовательность CIITA содержит по меньшей мере 10 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат. В некоторых вариантах осуществления геномная целевая последовательность CIITA содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат. В некоторых вариантах осуществления система редактирования генов содержит РНК-направляемый ДНК-связывающий агент. В некоторых вариантах осуществления РНК-направляемый ДНК-связывающий агент содержит дезаминазу. В некоторых вариантах осуществления РНК-направляемый ДНК-связывающий агент содержит дезаминазу и РНК-направляемую никазу. В некоторых вариантах осуществления деаминаза представляет собой дезаминазу APOBEC3, такую как APOBEC3A (A3A).

[00110] В некоторых вариантах осуществления предложена сконструированная клетка, в которой снижена или устранена поверхностная экспрессия MHC класса II с помощью системы редактирования генов, которая связывается с геномной целевой последовательностью CIITA, содержащей по меньшей мере 5 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат: 10918504-10918524. В некоторых вариантах осуществления предложена сконструированная клетка, в которой снижена или устранена поверхностная экспрессия MHC класса II с помощью системы редактирования генов, которая связывается с геномной цеелвой последовательностью CIITA, содержащей по меньшей мере 5 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат chr16:10923218-10923238. В некоторых вариантах осуществления предложена сконструированная клетка, в которой снижена или устранена поверхностная экспрессия MHC класса II с помощью системы редактирования генов, которая связывается с геномной цеелвой последовательностью CIITA, содержащей по меньшей мере 5 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат chr16:10923219-10923239. В некоторых вариантах осуществления геномная целевая последовательность CIITA содержит по меньшей мере 10 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат. В некоторых вариантах осуществления геномная целевая последовательность CIITA содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат. В некоторых вариантах осуществления система редактирования генов содержит РНК-направляемый ДНК-связывающий агент. В некоторых вариантах осуществления РНК-направляемый ДНК-связывающий агент содержит дезаминазу. В некоторых вариантах осуществления РНК-направляемый ДНК-связывающий агент содержит дезаминазу и РНК-направляемую никазу. В некоторых вариантах осуществления деаминаза представляет собой дезаминазу APOBEC3, такую как APOBEC3A (A3A).

[00111] В некоторых вариантах осуществления для каждого заданного диапазона геномных координат диапазон может охватывать +/- 10 нуклеотидов на любом конце

указанных координат. Для каждого заданного диапазона геномных координат диапазон может охватывать +/- 5 нуклеотидов на любом конце диапазона. Например, если указано chr16: 10923222-10923242, в некоторых вариантах осуществления геномная целевая последовательность или генетическая модификация могут находиться в пределах chr16:10923212-10923252.

[00112] В некоторых вариантах осуществления заданный диапазон геномных координат может включать целевую последовательность на обеих цепях ДНК (*т.е.* плюс (+) цепь и минус (-) цепь).

[00113] Генетические модификации в гене CIITA описаны далее в данном документе. В некоторых вариантах осуществления генетическая модификация в гене CIITA включает любую одну или большее количество вставок, делеций, замен или дезаминирования по меньшей мере одного нуклеотида в целевой последовательности. В некоторых вариантах осуществления предложена сконструированная клетка, в которой снижена или устранена поверхностная экспрессия MHC класса II по сравнению с немодифицированной клеткой, содержащая генетическую модификацию в гене CIITA, где генетическая модификация инактивирует сайт сплайсинга. В некоторых вариантах осуществления предложена сконструированная клетка, в которой снижена или устранена поверхностная экспрессия MHC класса II по сравнению с немодифицированной клеткой, содержащая генетическую модификацию в гене CIITA, где генетическая модификация включает вставку нуклеотида в сайте сплайсинга. В некоторых вариантах осуществления предложена сконструированная клетка, в которой снижена или устранена поверхностная экспрессия MHC класса II по сравнению с немодифицированной клеткой, содержащая генетическую модификацию в гене CIITA, где генетическая модификация включает делецию нуклеотида сайта сплайсинга. В некоторых вариантах осуществления предложена сконструированная клетка, в которой снижена или устранена поверхностная экспрессия MHC класса II по сравнению с немодифицированной клеткой, содержащая генетическую модификацию в гене CIITA, где генетическая модификация включает замену нуклеотида сайта сплайсинга. В некоторых вариантах осуществления предложена сконструированная клетка, в которой снижена или устранена поверхностная экспрессия MHC класса II по сравнению с немодифицированной клеткой, содержащая генетическую модификацию в гене CIITA, где генетическая модификация включает дезаминирование нуклеотида сайта сплайсинга.

[00114] В некоторых вариантах осуществления предложена сконструированная клетка, в которой снижена или устранена поверхностная экспрессия MHC класса II по сравнению с немодифицированной клеткой, содержащая генетическую модификацию гена CIITA, как описано в данном документе, и где в клетке дополнительно снижена или устранена поверхностная экспрессия HLA-A. В некоторых вариантах осуществления сконструированная клетка содержит генетическую модификацию в гене HLA-A. В некоторых вариантах осуществления сконструированная клетка содержит генетическую модификацию в гене HLA-A, где клетка является гомозиготной по HLA-B и гомозиготной

по HLA-C. В некоторых вариантах осуществления сконструированная клетка содержит генетическую модификацию, устраняющую экспрессию белка HLA-A на поверхности сконструированной клетки.

[00115] Сконструированные клетки человека, описанные в настоящем документе, могут содержать генетическую модификацию в любом аллеле HLA-A гена HLA-A. Ген HLA расположен в хромосоме 6 в геномной области, называемой суперлокусом HLA; сотни аллелей HLA-A были зарегистрированы в данной области техники (*см., например,* Shiina et al., Nature 54:15-39 (2009). Последовательности аллелей HLA-A доступны в данной области техники (*см., например*, базу данных IPD-IMGT/HLA для поиска последовательностей конкретных аллелей HLA-A https://www.ebi.ac.uk/ipd/imgt/hla/allele.html).

[00116] В любом из вышеприведенных вариантов осуществления предложена сконструированная клетка, в которой снижена или устранена поверхностная экспрессия MHC класса II по сравнению с немодифицированной клеткой, содержащая генетическую модификацию в гене CIITA, где модификация включает по меньшей мере один нуклеотид сайта сплайсинга в пределах геномных координат chr16:10902171-10923242, дополнительно включает генетическую модификацию в гене HLA-A, и где генетическая модификация в гене HLA-A включает по меньшей мере один нуклеотид в пределах геномных координат, выбранных из: от chr6:29942854 до chr6:29942913 и от chr6:29943518 до chr6:29943619. В некоторых вариантах осуществления клетка содержит генетическую модификацию в гене HLA-A, и где генетическая модификация в гене HLA-A включает по меньшей мере один нуклеотид в пределах геномных координат, выбранных из: от chr6:29942864 до chr6:29942903. В некоторых вариантах осуществления клетка содержит генетическую модификацию в гене HLA-A, где генетическая модификация в гене HLA-A включает по меньшей мере один нуклеотид в пределах геномных координат, выбранных из: от chr6:29943528 до chr6:29943609. В некоторых вариантах осуществления клетка содержит генетическую модификацию в гене HLA-A, и где генетическая модификация в гене HLA-A включает по меньшей мере один нуклеотид в пределах геномных координат, выбранных из: chr6:29942864-29942884; chr6:29942868-29942888; chr6:29942876-29942896; chr6:29942877-29942897; chr6:29942883-29942903; chr6:29943126-29943146; chr6:29943528-29943548; chr6:29943529-29943549; chr6:29943530-29943550; chr6:29943537-29943557; chr6:29943549-29943569; chr6:29943589-29943609 и chr6:29944026-29944046. В некоторых вариантах осуществления клетка содержит генетическую модификацию в гене HLA-A, и где генетическая модификация в гене HLA-A включает индел, замену C на T или замену A на G в пределах геномных координат, выбранных из: chr6:29942864-29942884; chr6:29942868-29942888; chr6:29942876-29942896; chr6:29942877-29942897; chr6:29942883-29942903; chr6:29943126-29943146; chr6:29943528-29943548; chr6:29943529-29943549; chr6:29943530-29943550; chr6:29943537-29943557; chr6:29943549-29943569; chr6:29943589-29943609 и chr6:29944026-29944046. В некоторых

вариантах осуществления экспрессия HLA-A в клетке снижена или устранена с помощью системы редактирования генов, которая связывается с геномной целевой последовательностью HLA-A, содержащей по меньшей мере 5 смежных нуклеотидов в геномных координатах, выбранных из: chr6:29942864-29942884; chr6:29942868-29942888; chr6:29942876-29942896; chr6:29942877-29942897; chr6:29942883-29942903; chr6:29943126-29943146; chr6:29943528-29943548; chr6:29943529-29943549; chr6:29943530-29943550; chr6:29943537-29943557; chr6:29943549-29943569; chr6:29943589-29943609; и chr6:29944026-29944046. В некоторых вариантах осуществления клетка является гомозиготной по HLA-B и гомозиготной по HLA-C.

[00117] В некоторых вариантах осуществления предложена сконструированная клетка, в которой снижена или устранена поверхностная экспрессия MHC класса II по сравнению с немодифицированной клеткой, содержащая генетическую модификацию в гене CIITA, где генетическая модификация включает по меньшей мере один нуклеотид сайт сплайсинга в пределах геномных координат chr16: 10902171-10923242, и где клетка дополнительно содержит генетическую модификацию в гене HLA-A, и где генетическая модификация в гене HLA-A включает по меньшей мере один нуклеотид в пределах геномных координат, выбранных из: от chr6:29942854 до chr6:29942913 и от chr6:29943518 до chr6: 29943619. В некоторых вариантах осуществления клетка содержит генетическую модификацию в гене HLA-A, и где генетическая модификация в гене HLA-A включает по меньшей мере один нуклеотид в пределах геномных координат, выбранных из: от chr6:29942864 до chr6:29942903. В некоторых вариантах осуществления клетка содержит генетическую модификацию в гене HLA-A, где генетическая модификация в гене HLA-A включает по меньшей мере один нуклеотид в пределах геномных координат, выбранных из: от chr6:29943528 до chr6:29943609. В некоторых вариантах осуществления клетка содержит генетическую модификацию в гене HLA-A, и где генетическая модификация в гене HLA-A включает по меньшей мере один нуклеотид в пределах геномных координат, выбранных из: chr6:29942864-29942884; chr6:29942868-29942888; chr6:29942876-29942896; chr6:29942877-29942897; chr6:29942883-29942903; chr6:29943126-29943146; chr6:29943528-29943548; chr6:29943529-29943549; chr6:29943530-29943550; chr6:29943537-29943557; chr6:29943549-29943569; chr6:29943589-29943609 и chr6:29944026-29944046. В некоторых вариантах осуществления клетка содержит генетическую модификацию в гене HLA-A, и где генетическая модификация в гене HLA-A включает индел, замену C на T или замену A на G в пределах геномных координат, выбранных из: chr6:29942864-29942884; chr6:29942868-29942888; chr6:29942876-29942896; chr6:29942877-29942897; chr6:29942883-29942903; chr6:29943126-29943146; chr6:29943528-29943548; chr6:29943529-29943549; chr6:29943530-29943550; chr6:29943537-29943557; chr6:29943549-29943569; chr6:29943589-29943609 и chr6:29944026-29944046. В некоторых вариантах осуществления экспрессия HLA-A в клетке снижена или устранена с помощью системы редактирования генов, которая связывается с геномной целевой

последовательностью HLA-A, содержащей по меньшей мере 5 смежных нуклеотидов в геномных координатах, выбранных из: chr6:29942864-29942884; chr6:29942868-29942888; chr6:29942876-29942896; chr6:29942877-29942897; chr6:29942883-29942903; chr6:29943126-29943146; chr6:29943528-29943548; chr6:29943529-29943549; chr6:29943530-29943550; chr6:29943537-29943557; chr6:29943549-29943569; chr6:29943589-29943609; и chr6:29944026-29944046. В некоторых вариантах осуществления клетка является гомозиготной по HLA-B и гомозиготной по HLA-C.

[00118] В некоторых вариантах осуществления предложена сконструированная клетка, в которой снижена или устранена поверхностная экспрессия MHC класса II по сравнению с немодифицированной клеткой, содержащая генетическую модификацию в гене CIITA, где генетическая модификация включает по меньшей мере один нуклеотид сайт сплайсинга в пределах геномных координат chr16: 10902171-10923242, и где клетка дополнительно содержит генетическую модификацию в гене HLA-A, и где генетическая модификация в гене HLA-A включает по меньшей мере один нуклеотид в пределах геномных координат, выбранных из: от chr6:29942854 до chr6:29942913 и от chr6:29943518 до chr6: 29943619. В некоторых вариантах осуществления клетка содержит генетическую модификацию в гене HLA-A, и где генетическая модификация в гене HLA-A включает по меньшей мере один нуклеотид в пределах геномных координат, выбранных из: от chr6:29942864 до chr6:29942903. В некоторых вариантах осуществления клетка содержит генетическую модификацию в гене HLA-A, где генетическая модификация в гене HLA-A включает по меньшей мере один нуклеотид в пределах геномных координат, выбранных из: от chr6:29943528 до chr6:29943609. В некоторых вариантах осуществления клетка содержит генетическую модификацию в гене HLA-A, и где генетическая модификация в гене HLA-A включает по меньшей мере один нуклеотид в пределах геномных координат, выбранных из: chr6:29942864-29942884; chr6:29942868-29942888; chr6:29942876-29942896; chr6:29942877-29942897; chr6:29942883-29942903; chr6:29943126-29943146; chr6:29943528-29943548; chr6:29943529-29943549; chr6:29943530-29943550; chr6:29943537-29943557; chr6:29943549-29943569; chr6:29943589-29943609 и chr6:29944026-29944046. В некоторых вариантах осуществления клетка содержит генетическую модификацию в гене HLA-A, и где генетическая модификация в гене HLA-A включает индел, замену C на T или замену A на G в пределах геномных координат, выбранных из: chr6:29942864-29942884; chr6:29942868-29942888; chr6:29942876-29942896; chr6:29942877-29942897; chr6:29942883-29942903; chr6:29943126-29943146; chr6:29943528-29943548; chr6:29943529-29943549; chr6:29943530-29943550; chr6:29943537-29943557; chr6:29943549-29943569; chr6:29943589-29943609 и chr6:29944026-29944046. В некоторых вариантах осуществления экспрессия HLA-A в клетке снижена или устранена с помощью системы редактирования генов, которая связывается с геномной целевой последовательностью HLA-A, содержащей по меньшей мере 5 смежных нуклеотидов в геномных координатах, выбранных из: chr6:29942864-29942884; chr6:29942868-29942888;

chr6:29942876-29942896; chr6:29942877-29942897; chr6:29942883-29942903; chr6:29943126-29943146; chr6:29943528-29943548; chr6:29943529-29943549; chr6:29943530-29943550; chr6:29943537-29943557; chr6:29943549-29943569; chr6:29943589-29943609; и chr6:29944026-29944046. В некоторых вариантах осуществления клетка является гомозиготной по HLA-B и гомозиготной по HLA-C.

[00119] В некоторых вариантах осуществления предложена сконструированная клетка, в которой снижена или устранена поверхностная экспрессия MHC класса II по сравнению с немодифицированной клеткой, содержащая генетическую модификацию в гене CIITA, где генетическая модификация включает по меньшей мере один нуклеотид сайта сплайсинга в пределах геномных координат, выбранных из: chr16:10908132-10908152, chr16:10908131-10908151, chr16:10916456-10916476, chr16:10918504-10918524, chr16:10909022-10909042, chr16:10918512-10918532, chr16:10918511-10918531, chr16:10895742-10895762, chr16:10916362-10916382, chr16:10916455-10916475, chr16:10909172-10909192, chr16:10906492-10906512, chr16:10909006-10909026, chr16:10922478-10922498, chr16:10895747-10895767, chr16:10916348-10916368, chr16:10910186-10910206, chr16:10906481-10906501, chr16:10909007-10909027, chr16:10895410-10895430 и chr16:10908130-10908150, и где клетка дополнительно содержит генетическую модификацию в гене HLA-A, и при это генетическая модификация в гене HLA-A включает по меньшей мере один нуклеотид в пределах геномных координат, выбранных из: от chr6:29942854 до chr6:29942913 и от chr6:29943518 до chr6:29943619. В некоторых вариантах осуществления предложена сконструированная клетка, в которой снижена или устранена поверхностная экспрессия MHC класса II по сравнению с немодифицированной клеткой, содержащая генетическую модификацию в гене CIITA, где генетическая модификация включает по меньшей мере один нуклеотид сайта сплайсинга в пределах геномных координат, выбранных из: chr16:10918504-10918524, chr16:10923218-10923238, chr16:10923219-10923239, chr16:10923221-10923241, chr16:10906486-10906506, chr16:10906485-10906505, chr16:10903873-10903893, chr16:10909172-10909192, chr16:10918423-10918443, chr16:10916362-10916382, chr16:10916450-10916470, chr16:10922153-10922173, chr16:10923222-10923242, chr16:10910176-10910196, chr16:10895742-10895762, chr16:10916449-10916469, chr16:10923214-10923234, chr16:10906492-10906512 и chr16:10906487-10906507, и где клетка дополнительно содержит генетическую модификацию в гене HLA-A, и где генетическая модификация в гене HLA-A включает по меньшей мере один нуклеотид в пределах геномных координат, выбранных из: от chr6:29942854 до chr6:29942913 и от chr6:29943518 до chr6: 29943619. В некоторых вариантах осуществления клетка содержит генетическую модификацию в гене HLA-A, и где генетическая модификация в гене HLA-A включает по меньшей мере один нуклеотид в пределах геномных координат, выбранных из: от chr6:29942864 до chr6:29942903. В некоторых вариантах осуществления клетка содержит генетическую модификацию в гене HLA-A, где генетическая модификация в гене HLA-A включает по меньшей мере один

нуклеотид в пределах геномных координат, выбранных из: от chr6:29943528 до chr6:29943609. В некоторых вариантах осуществления клетка содержит генетическую модификацию в гене HLA-A, и где генетическая модификация в гене HLA-A включает по меньшей мере один нуклеотид в пределах геномных координат, выбранных из: chr6:29942864-29942884; chr6:29942868-29942888; chr6:29942876-29942896; chr6:29942877-29942897; chr6:29942883-29942903; chr6:29943126-29943146; chr6:29943528-29943548; chr6:29943529-29943549; chr6:29943530-29943550; chr6:29943537-29943557; chr6:29943549-29943569; chr6:29943589-29943609 и chr6:29944026-29944046. В некоторых вариантах осуществления клетка содержит генетическую модификацию в гене HLA-A, и где генетическая модификация в гене HLA-A включает индел, замену C на T или замену A на G в пределах геномных координат, выбранных из: chr6:29942864-29942884; chr6:29942868-29942888; chr6:29942876-29942896; chr6:29942877-29942897; chr6:29942883-29942903; chr6:29943126-29943146; chr6:29943528-29943548; chr6:29943529-29943549; chr6:29943530-29943550; chr6:29943537-29943557; chr6:29943549-29943569; chr6:29943589-29943609 и chr6:29944026-29944046. В некоторых вариантах осуществления экспрессия HLA-A в клетке снижена или устранена с помощью системы редактирования генов, которая связывается с геномной целевой последовательностью HLA-A, содержащей по меньшей мере 5 смежных нуклеотидов в геномных координатах, выбранных из: chr6:29942864-29942884; chr6:29942868-29942888; chr6:29942876-29942896; chr6:29942877-29942897; chr6:29942883-29942903; chr6:29943126-29943146; chr6:29943528-29943548; chr6:29943529-29943549; chr6:29943530-29943550; chr6:29943537-29943557; chr6:29943549-29943569; chr6:29943589-29943609; и chr6:29944026-29944046. В некоторых вариантах осуществления клетка является гомозиготной по HLA-B и гомозиготной по HLA-C.

[00120] В некоторых вариантах осуществления предложена сконструированная клетка, в которой снижена или устранена поверхностная экспрессия MHC класса II по сравнению с немодифицированной клеткой, содержащая генетическую модификацию в гене CIITA, где генетическая модификация включает по меньшей мере один нуклеотид сайта сплайсинга в пределах геномных координат, выбранных из: chr16:10918504-10918524, chr16:10923218-10923238, chr16:10923219-10923239, chr16:10923221-10923241, chr16:10906485-10906505, chr16:10916359-10916379, chr16:10903873-10903893, chr16:10909172-10909192, chr16:10922153-10922173, chr16:10916450-10916470, chr16:10923222-10923242, chr16:10916449-10916469 и chr16:10923214-10923234, и где клетка дополнительно содержит генетическую модификацию в гене HLA-A, и при это генетическая модификация в гене HLA-A включает по меньшей мере один нуклеотид в пределах геномных координат, выбранных из: от chr6:29942854 до chr6:29942913 и от chr6:29943518 до chr6: 29943619. В некоторых вариантах осуществления предложена сконструированная клетка, в которой снижена или устранена поверхностная экспрессия MHC класса II по сравнению с немодифицированной клеткой, содержащая генетическую

модификацию в гене CIITA, где генетическая модификация включает по меньшей мере один нуклеотид сайта сплайсинга в пределах геномных координат, выбранных из: chr16:10918504-10918524, chr16:10923218-10923238, chr16:10923219-10923239, chr16:10923221-10923241, chr16:10906485-10906505, chr16:10916359-10916379, chr16:10903873-10903893, chr16:10909172-10909192, chr16:10922153-10922173, chr16:10916450-10916470, chr16:10923222-10923242, chr16:10916449-10916469 и chr16:10923214-10923234, и где клетка дополнительно содержит генетическую модификацию в гене HLA-A, и при это генетическая модификация в гене HLA-A включает по меньшей мере один нуклеотид в пределах геномных координат, выбранных из: от chr6:29942854 до chr6:29942913 и от chr6:29943518 до chr6: 29943619. В некоторых вариантах осуществления клетка содержит генетическую модификацию в гене HLA-A, и где генетическая модификация в гене HLA-A включает по меньшей мере один нуклеотид в пределах геномных координат, выбранных из: от chr6:29942864 до chr6:29942903. В некоторых вариантах осуществления клетка содержит генетическую модификацию в гене HLA-A, где генетическая модификация в гене HLA-A включает по меньшей мере один нуклеотид в пределах геномных координат, выбранных из: от chr6:29943528 до chr6:29943609. В некоторых вариантах осуществления клетка содержит генетическую модификацию в гене HLA-A, и где генетическая модификация в гене HLA-A включает по меньшей мере один нуклеотид в пределах геномных координат, выбранных из: chr6:29942864-29942884; chr6:29942868-29942888; chr6:29942876-29942896; chr6:29942877-29942897; chr6:29942883-29942903; chr6:29943126-29943146; chr6:29943528-29943548; chr6:29943529-29943549; chr6:29943530-29943550; chr6:29943537-29943557; chr6:29943549-29943569; chr6:29943589-29943609 и chr6:29944026-29944046. В некоторых вариантах осуществления клетка содержит генетическую модификацию в гене HLA-A, и где генетическая модификация в гене HLA-A включает индел, замену C на T или замену A на G в пределах геномных координат, выбранных из: chr6:29942864-29942884; chr6:29942868-29942888; chr6:29942876-29942896; chr6:29942877-29942897; chr6:29942883-29942903; chr6:29943126-29943146; chr6:29943528-29943548; chr6:29943529-29943549; chr6:29943530-29943550; chr6:29943537-29943557; chr6:29943549-29943569; chr6:29943589-29943609 и chr6:29944026-29944046. В некоторых вариантах осуществления экспрессия HLA-A в клетке снижена или устранена с помощью системы редактирования генов, которая связывается с геномной целевой последовательностью HLA-A, содержащей по меньшей мере 5 смежных нуклеотидов в геномных координатах, выбранных из: chr6:29942864-29942884; chr6:29942868-29942888; chr6:29942876-29942896; chr6:29942877-29942897; chr6:29942883-29942903; chr6:29943126-29943146; chr6:29943528-29943548; chr6:29943529-29943549; chr6:29943530-29943550; chr6:29943537-29943557; chr6:29943549-29943569; chr6:29943589-29943609; и chr6:29944026-29944046. В некоторых вариантах осуществления клетка является гомозиготной по HLA-B и гомозиготной по HLA-C.

[00121] В некоторых вариантах осуществления предложена сконструированная клетка, в которой снижена или устранена поверхностная экспрессия MHC класса II по сравнению с немодифицированной клеткой, содержащая генетическую модификацию в гене CIITA, где генетическая модификация включает по меньшей мере один нуклеотид сайта сплайсинга в пределах геномных координат, выбранных из: chr16:10918504-10918524, chr16:10923218-10923238, chr16:10923219-10923239, chr16:10923221-10923241, chr16:10906485-10906505, chr16:10916359-10916379, chr16:10903873-10903893, chr16:10909172-10909192, chr16:10922153-10922173 и chr16:10916450-10916470, и где клетка дополнительно содержит генетическую модификацию в гене HLA-A, и при это генетическая модификация в гене HLA-A включает по меньшей мере один нуклеотид в пределах геномных координат, выбранных из: от chr6:29942854 до chr6:29942913 и от chr6:29943518 до chr6: 29943619. В некоторых вариантах осуществления предложена сконструированная клетка, в которой снижена или устранена поверхностная экспрессия MHC класса II по сравнению с немодифицированной клеткой, содержащая генетическую модификацию в гене CIITA, где генетическая модификация включает по меньшей мере один нуклеотид сайта сплайсинга в пределах геномных координат, выбранных из: chr16:10918504-10918524, chr16:10923218-10923238, chr16:10923219-10923239, chr16:10923221-10923241, chr16:10906485-10906505, chr16:10916359-10916379, chr16:10903873-10903893, chr16:10909172-10909192, chr16:10922153-10922173 и chr16:10916450-10916470, и где клетка дополнительно содержит генетическую модификацию в гене HLA-A, и при это генетическая модификация в гене HLA-A включает по меньшей мере один нуклеотид в пределах геномных координат, выбранных из: от chr6:29942854 до chr6:29942913 и от chr6:29943518 до chr6: 29943619. В некоторых вариантах осуществления клетка содержит генетическую модификацию в гене HLA-A, и где генетическая модификация в гене HLA-A включает по меньшей мере один нуклеотид в пределах геномных координат, выбранных из: от chr6:29942864 до chr6:29942903. В некоторых вариантах осуществления клетка содержит генетическую модификацию в гене HLA-A, где генетическая модификация в гене HLA-A включает по меньшей мере один нуклеотид в пределах геномных координат, выбранных из: от chr6:29943528 до chr6:29943609. В некоторых вариантах осуществления клетка содержит генетическую модификацию в гене HLA-A, и где генетическая модификация в гене HLA-A включает по меньшей мере один нуклеотид в пределах геномных координат, выбранных из: chr6:29942864-29942884; chr6:29942868-29942888; chr6:29942876-29942896; chr6:29942877-29942897; chr6:29942883-29942903; chr6:29943126-29943146; chr6:29943528-29943548; chr6:29943529-29943549; chr6:29943530-29943550; chr6:29943537-29943557; chr6:29943549-29943569; chr6:29943589-29943609 и chr6:29944026-29944046. В некоторых вариантах осуществления клетка содержит генетическую модификацию в гене HLA-A, и где генетическая модификация в гене HLA-A включает индел, замену C на T или замену A на G в пределах геномных координат, выбранных из: chr6:29942864-29942884; chr6:29942868-29942888; chr6:29942876-

29942896; chr6:29942877-29942897; chr6:29942883-29942903; chr6:29943126-29943146; chr6:29943528-29943548; chr6:29943529-29943549; chr6:29943530-29943550; chr6:29943537-29943557; chr6:29943549-29943569; chr6:29943589-29943609 и chr6:29944026-29944046. В некоторых вариантах осуществления экспрессия HLA-A в клетке снижена или устранена с помощью системы редактирования генов, которая связывается с геномной целевой последовательностью HLA-A, содержащей по меньшей мере 5 смежных нуклеотидов в геномных координатах, выбранных из: chr6:29942864-29942884; chr6:29942868-29942888; chr6:29942876-29942896; chr6:29942877-29942897; chr6:29942883-29942903; chr6:29943126-29943146; chr6:29943528-29943548; chr6:29943529-29943549; chr6:29943530-29943550; chr6:29943537-29943557; chr6:29943549-29943569; chr6:29943589-29943609; и chr6:29944026-29944046. В некоторых вариантах осуществления клетка является гомозиготной по HLA-B и гомозиготной по HLA-C.

[00122] В некоторых вариантах осуществления предложена сконструированная клетка, в которой снижена или устранена поверхностная экспрессия MHC класса II по сравнению с немодифицированной клеткой, содержащая генетическую модификацию в гене CIITA, где генетическая модификация включает по меньшей мере один нуклеотид сайта сплайсинга в пределах геномных координат, выбранных из: chr16:10908132-10908152, chr16:10908131-10908151, chr16:10916456-10916476, chr16:10918504-10918524, и где клетка дополнительно содержит генетическую модификацию в гене HLA-A, и при это генетическая модификация в гене HLA-A включает по меньшей мере один нуклеотид в пределах геномных координат, выбранных из: от chr6:29942854 до chr6:29942913 и от chr6:29943518 до chr6: 29943619. В некоторых вариантах осуществления предложена сконструированная клетка, в которой снижена или устранена поверхностная экспрессия MHC класса II по сравнению с немодифицированной клеткой, содержащая генетическую модификацию в гене CIITA, где генетическая модификация включает по меньшей мере один нуклеотид сайта сплайсинга в пределах геномных координат, выбранных из: chr16:10918504-10918524, chr16:10923218-10923238, chr16:10923219-10923239, и где клетка дополнительно содержит генетическую модификацию в гене HLA-A, и при это генетическая модификация в гене HLA-A включает по меньшей мере один нуклеотид в пределах геномных координат, выбранных из: от chr6:29942854 до chr6:29942913 и от chr6:29943518 до chr6: 29943619. В некоторых вариантах осуществления клетка содержит генетическую модификацию в гене HLA-A, и где генетическая модификация в гене HLA-A включает по меньшей мере один нуклеотид в пределах геномных координат, выбранных из: от chr6:29942864 до chr6:29942903. В некоторых вариантах осуществления клетка содержит генетическую модификацию в гене HLA-A, где генетическая модификация в гене HLA-A включает по меньшей мере один нуклеотид в пределах геномных координат, выбранных из: от chr6:29943528 до chr6:29943609. В некоторых вариантах осуществления клетка содержит генетическую модификацию в гене HLA-A, и где генетическая модификация в гене HLA-A включает по меньшей мере один нуклеотид

в пределах геномных координат, выбранных из: chr6:29942864-29942884; chr6:29942868-29942888; chr6:29942876-29942896; chr6:29942877-29942897; chr6:29942883-29942903; chr6:29943126-29943146; chr6:29943528-29943548; chr6:29943529-29943549; chr6:29943530-29943550; chr6:29943537-29943557; chr6:29943549-29943569; chr6:29943589-29943609 и chr6:29944026-29944046. В некоторых вариантах осуществления клетка содержит генетическую модификацию в гене HLA-A, и где генетическая модификация в гене HLA-A включает индел, замену C на T или замену A на G в пределах геномных координат, выбранных из: chr6:29942864-29942884; chr6:29942868-29942888; chr6:29942876-29942896; chr6:29942877-29942897; chr6:29942883-29942903; chr6:29943126-29943146; chr6:29943528-29943548; chr6:29943529-29943549; chr6:29943530-29943550; chr6:29943537-29943557; chr6:29943549-29943569; chr6:29943589-29943609 и chr6:29944026-29944046. В некоторых вариантах осуществления экспрессия HLA-A в клетке снижена или устранена с помощью системы редактирования генов, которая связывается с геномной целевой последовательностью HLA-A, содержащей по меньшей мере 5 смежных нуклеотидов в геномных координатах, выбранных из: chr6:29942864-29942884; chr6:29942868-29942888; chr6:29942876-29942896; chr6:29942877-29942897; chr6:29942883-29942903; chr6:29943126-29943146; chr6:29943528-29943548; chr6:29943529-29943549; chr6:29943530-29943550; chr6:29943537-29943557; chr6:29943549-29943569; chr6:29943589-29943609; и chr6:29944026-29944046. В некоторых вариантах осуществления клетка является гомозиготной по HLA-B и гомозиготной по HLA-C.

[00123] В некоторых вариантах осуществления предложена сконструированная клетка, в которой снижена или устранена поверхностная экспрессия MHC класса II по сравнению с немодифицированной клеткой, содержащая генетическую модификацию в гене CIITA, где модификация включает по меньшей мере один нуклеотид сайта сплайсинга в пределах геномных координат chr16:10902171-10923242, и где в клетке дополнительно снижена или устранена поверхностная экспрессия MHC класса I. В некоторых вариантах осуществления сконструированная клетка содержит генетическую модификацию в гене бета-2-микроглобулина (B2M). В некоторых вариантах осуществления сконструированная клетка содержит генетическую модификацию, которая снижает экспрессию белка MHC класса I на поверхности сконструированной клетки.

[00124] В некоторых вариантах осуществления предложена сконструированная клетка, в которой снижена или устранена поверхностная экспрессия MHC класса II по сравнению с немодифицированной клеткой, содержащая генетическую модификацию в гене CIITA, где модификация включает по меньшей мере один нуклеотид сайта сплайсинга в пределах геномных координат chr16:10902171-10923242, и где клетка дополнительно содержит экзогенную нуклеиновую кислоту. В некоторых вариантах осуществления экзогенная нуклеиновая кислота кодирует нацеливающий рецептор, который экспрессируется на поверхности сконструированной клетки. В некоторых вариантах осуществления нацеливающий рецептор представляет собой химерный

антигенный рецептор (CAR). В некоторых вариантах осуществления нацеливающий рецептор представляет собой универсальный CAR (UniCAR). В некоторых вариантах осуществления нацеливающий рецептор представляет собой Т-клеточный рецептор (ТКР). В некоторых вариантах осуществления нацеливающий рецептор представляет собой ТКР WT1. В некоторых вариантах осуществления нацеливающий рецептор представляет собой гибрид CAR/ТКР. В некоторых вариантах осуществления нацеливающий рецептор содержит домен распознавания антигена (например, домен распознавания ракового антигена и субъединицу ТКР). В некоторых вариантах осуществления нацеливающий рецептор представляет собой цитокиновый рецептор. В некоторых вариантах осуществления нацеливающий рецептор представляет собой хемокиновый рецептор. В некоторых вариантах осуществления нацеливающий рецептор представляет собой рецептор В-клеток (BCR). В некоторых вариантах осуществления экзогенная нуклеиновая кислота кодирует полипептид, который секретируется сконструированной клеткой (т.е. растворимый полипептид). В некоторых вариантах осуществления экзогенная нуклеиновая кислота кодирует терапевтический полипептид. В некоторых вариантах осуществления экзогенная нуклеиновая кислота кодирует антитело. В некоторых вариантах осуществления экзогенная нуклеиновая кислота кодирует фермент. В некоторых вариантах осуществления экзогенная нуклеиновая кислота кодирует цитокин. В некоторых вариантах осуществления экзогенная нуклеиновая кислота кодирует хемокин. В некоторых вариантах осуществления экзогенная нуклеиновая кислота кодирует слитый белок.

[00125] В некоторых вариантах осуществления предложена сконструированная клетка, в которой снижена или устранена поверхностная экспрессия МНС класса II по сравнению с немодифицированной клеткой, содержащая генетическую модификацию в гене CIITA, где модификация включает по меньшей мере один нуклеотид сайта сплайсинга в пределах геномных координат chr16:10902171-10923242, где в клетке дополнительно снижена или устранена поверхностная экспрессия МНС класса I, и где клетка дополнительно содержит экзогенную нуклеиновую кислоту. В некоторых вариантах осуществления сконструированная клетка содержит генетическую модификацию в гене бета-2-микроглобулина (B2M). В некоторых вариантах осуществления сконструированная клетка содержит генетическую модификацию, которая снижает экспрессию белка МНС класса I на поверхности сконструированной клетки. В некоторых вариантах осуществления экзогенная нуклеиновая кислота кодирует нацеливающий рецептор, который экспрессируется на поверхности сконструированной клетки. В некоторых вариантах осуществления нацеливающий рецептор представляет собой химерный антигенный рецептор (CAR). В некоторых вариантах осуществления нацеливающий рецептор представляет собой универсальный CAR (UniCAR). В некоторых вариантах осуществления нацеливающий рецептор представляет собой Т-клеточный рецептор (ТКР). В некоторых вариантах осуществления нацеливающий рецептор представляет собой ТКР WT1. В некоторых вариантах осуществления нацеливающий

рецептор представляет собой гибрид CAR/TKP. В некоторых вариантах осуществления нацеливающий рецептор содержит домен распознавания антигена (например, домен распознавания ракового антигена и субъединицу TKP). В некоторых вариантах осуществления нацеливающий рецептор представляет собой цитокиновый рецептор. В некоторых вариантах осуществления нацеливающий рецептор представляет собой хемокиновый рецептор. В некоторых вариантах осуществления нацеливающий рецептор представляет собой рецептор В-клеток (BCR). В некоторых вариантах осуществления экзогенная нуклеиновая кислота кодирует полипептид, который секретируется сконструированной клеткой (т.е. растворимый полипептид). В некоторых вариантах осуществления экзогенная нуклеиновая кислота кодирует терапевтический полипептид. В некоторых вариантах осуществления экзогенная нуклеиновая кислота кодирует антитело. В некоторых вариантах осуществления экзогенная нуклеиновая кислота кодирует фермент. В некоторых вариантах осуществления экзогенная нуклеиновая кислота кодирует цитокин. В некоторых вариантах осуществления экзогенная нуклеиновая кислота кодирует хемокин. В некоторых вариантах осуществления экзогенная нуклеиновая кислота кодирует слитый белок.

[00126] В некоторых вариантах осуществления предложена сконструированная клетка, в которой снижена или устранена поверхностная экспрессия MHC класса II по сравнению с немодифицированной клеткой, содержащая генетическую модификацию в гене CIITA, где модификация включает по меньшей мере один нуклеотид экзона в пределах геномных координат chr16: 10902662-chr16:10923285, где в клетке дополнительно снижена или устранена поверхностная экспрессия HLA-A, и где клетка дополнительно содержит экзогенную нуклеиновую кислоту. В некоторых вариантах осуществления сконструированная клетка содержит генетическую модификацию в гене HLA-A. В некоторых вариантах осуществления сконструированная клетка содержит генетическую модификацию, которая снижает экспрессию белка HLA-A на поверхности сконструированной клетки. В некоторых вариантах осуществления экзогенная нуклеиновая кислота кодирует нацеливающий рецептор, который экспрессируется на поверхности сконструированной клетки. В некоторых вариантах осуществления нацеливающий рецептор представляет собой химерный антигенный рецептор (CAR). В некоторых вариантах осуществления нацеливающие рецепторы представляют собой универсальный CAR (UniCAR). В некоторых вариантах осуществления нацеливающий рецептор представляет собой Т-клеточный рецептор (TKP). В некоторых вариантах осуществления нацеливающий рецептор представляет собой TKP WT1. В некоторых вариантах осуществления нацеливающий рецептор представляет собой гибрид CAR/TKP. В некоторых вариантах осуществления нацеливающий рецептор содержит домен распознавания антигена (например, домен распознавания ракового антигена и субъединицу TKP). В некоторых вариантах осуществления нацеливающий рецептор представляет собой цитокиновый рецептор. В некоторых вариантах осуществления нацеливающий рецептор представляет собой хемокиновый рецептор. В некоторых

вариантах осуществления нацеливающий рецептор представляет собой рецептор В-клеток (BCR). В некоторых вариантах осуществления экзогенная нуклеиновая кислота кодирует полипептид, который секретируется сконструированной клеткой (т.е. растворимый полипептид). В некоторых вариантах осуществления экзогенная нуклеиновая кислота кодирует терапевтический полипептид. В некоторых вариантах осуществления экзогенная нуклеиновая кислота кодирует антитело. В некоторых вариантах осуществления экзогенная нуклеиновая кислота кодирует фермент. В некоторых вариантах осуществления экзогенная нуклеиновая кислота кодирует цитокин. В некоторых вариантах осуществления экзогенная нуклеиновая кислота кодирует хемокин. В некоторых вариантах осуществления экзогенная нуклеиновая кислота кодирует слитый белок.

[00127] В некоторых вариантах осуществления предложена сконструированная клетка, в которой снижена или устранена поверхностная экспрессия MHC класса II по сравнению с немодифицированной клеткой, содержащая генетическую модификацию в гене CIITA, где модификация включает по меньшей мере один нуклеотид сайта сплайсинга в пределах геномных координат chr16:10902171-10923242, и где в клетке дополнительно снижена или устранена экспрессия эндогенного белка TKP по сравнению с немодифицированной клеткой. В некоторых вариантах осуществления предложена сконструированная клетка, в которой снижена или устранена поверхностная экспрессия MHC класса II по сравнению с немодифицированной клеткой, содержащая генетическую модификацию в гене CIITA, где модификация включает по меньшей мере один нуклеотид сайта сплайсинга в пределах геномных координат chr16:10902171-10923242, и где клетка дополнительно содержит экзогенную нуклеиновую кислоту и дополнительно имеет сниженную или устраненную экспрессию эндогенного белка TKP по сравнению с немодифицированной клеткой. В некоторых вариантах осуществления предложена сконструированная клетка, в которой снижена или устранена поверхностная экспрессия MHC класса II по сравнению с немодифицированной клеткой, содержащая генетическую модификацию в гене CIITA, где модификация включает по меньшей мере один нуклеотид сайта сплайсинга в пределах геномных координат chr16:10902171-10923242, и где в клетке дополнительно снижена или устранена поверхностная экспрессия MHC класса I, и где в клетке дополнительно снижена или устранена экспрессия эндогенного белка TKP по сравнению с немодифицированной клеткой.

[00128] В некоторых вариантах осуществления предложена сконструированная клетка, в которой снижена или устранена поверхностная экспрессия MHC класса II по сравнению с немодифицированной клеткой, содержащая генетическую модификацию в гене CIITA, где модификация включает по меньшей мере один нуклеотид сайта сплайсинга в пределах геномных координат chr16:10902171-10923242, и где клетка дополнительно содержит экзогенную нуклеиновую кислоту, и где в клетке дополнительно снижена или устранена поверхностная экспрессия MHC класса I, и где в клетке дополнительно снижена или устранена экспрессия эндогенного белка TKP по сравнению с

немодифицированной клеткой. В некоторых вариантах осуществления в сконструированной клетке снижена или устранена экспрессия белка TRAC по сравнению с немодифицированной клеткой. В некоторых вариантах осуществления в сконструированной клетке снижена или устранена экспрессия белка TRBC по сравнению с немодифицированной клеткой. В некоторых вариантах осуществления сконструированная клетка содержит генетическую модификацию в гене бета-2-микроглобулина (B2M). В некоторых вариантах осуществления сконструированная клетка содержит генетическую модификацию, которая снижает экспрессию белка MHC класса I на поверхности сконструированной клетки. В некоторых вариантах осуществления экзогенная нуклеиновая кислота кодирует нацеливающий рецептор, который экспрессируется на поверхности сконструированной клетки. В некоторых вариантах осуществления нацеливающий рецептор представляет собой химерный антигенный рецептор (CAR). В некоторых вариантах осуществления нацеливающие рецепторы представляют собой универсальный CAR (UniCAR). В некоторых вариантах осуществления нацеливающий рецептор представляет собой Т-клеточный рецептор (TKP). В некоторых вариантах осуществления нацеливающий рецептор представляет собой TKP WT1. В некоторых вариантах осуществления нацеливающий рецептор представляет собой гибрид CAR/TKP. В некоторых вариантах осуществления нацеливающий рецептор содержит домен распознавания антигена (например, домен распознавания ракового антигена и субъединицу TKP). В некоторых вариантах осуществления нацеливающий рецептор представляет собой цитокиновый рецептор. В некоторых вариантах осуществления нацеливающий рецептор представляет собой хемокиновый рецептор. В некоторых вариантах осуществления нацеливающий рецептор представляет собой рецептор В-клеток (BCR). В некоторых вариантах осуществления экзогенная нуклеиновая кислота кодирует полипептид, который секретируется сконструированной клеткой (т.е. растворимый полипептид). В некоторых вариантах осуществления экзогенная нуклеиновая кислота кодирует терапевтический полипептид. В некоторых вариантах осуществления экзогенная нуклеиновая кислота кодирует антитело. В некоторых вариантах осуществления экзогенная нуклеиновая кислота кодирует фермент. В некоторых вариантах осуществления экзогенная нуклеиновая кислота кодирует цитокин. В некоторых вариантах осуществления экзогенная нуклеиновая кислота кодирует хемокин. В некоторых вариантах осуществления экзогенная нуклеиновая кислота кодирует слитый белок.

[00129] В некоторых вариантах осуществления предложена сконструированная клетка, в которой снижена или устранена поверхностная экспрессия MHC класса II по сравнению с немодифицированной клеткой, содержащая генетическую модификацию в гене CIITA, где модификация включает по меньшей мере один нуклеотид экзона в пределах геномных координат chr16: 10902662-chr16:10923285, и где клетка дополнительно содержит экзогенную нуклеиновую кислоту, и где в клетке дополнительно снижена или устранена поверхностная экспрессия HLA-A, и где в клетке дополнительно

снижена или устранена экспрессия эндогенного белка ТКР по сравнению с немодифицированная клетка. В некоторых вариантах осуществления в сконструированной клетке снижена или устранена экспрессия белка TRAC по сравнению с немодифицированной клеткой. В некоторых вариантах осуществления в сконструированной клетке снижена или устранена экспрессия белка TRBC по сравнению с немодифицированной клеткой. В некоторых вариантах осуществления сконструированная клетка содержит генетическую модификацию в гене HLA-A. В некоторых вариантах осуществления сконструированная клетка содержит генетическую модификацию, которая снижает экспрессию белка HLA-A на поверхности сконструированной клетки. В некоторых вариантах осуществления экзогенная нуклеиновая кислота кодирует нацеливающий рецептор, который экспрессируется на поверхности сконструированной клетки. В некоторых вариантах осуществления нацеливающий рецептор представляет собой химерный антигенный рецептор (CAR). В некоторых вариантах осуществления нацеливающие рецепторы представляют собой универсальный CAR (UniCAR). В некоторых вариантах осуществления нацеливающий рецептор представляет собой Т-клеточный рецептор (ТКР). В некоторых вариантах осуществления нацеливающий рецептор представляет собой ТКР WT1. В некоторых вариантах осуществления нацеливающий рецептор представляет собой гибрид CAR/ТКР. В некоторых вариантах осуществления нацеливающий рецептор содержит домен распознавания антигена (например, домен распознавания ракового антигена и субъединицу ТКР). В некоторых вариантах осуществления нацеливающий рецептор представляет собой цитокиновый рецептор. В некоторых вариантах осуществления нацеливающий рецептор представляет собой хемокиновый рецептор. В некоторых вариантах осуществления нацеливающий рецептор представляет собой рецептор В-клеток (BCR). В некоторых вариантах осуществления экзогенная нуклеиновая кислота кодирует полипептид, который секретируется сконструированной клеткой (т.е. растворимый полипептид). В некоторых вариантах осуществления экзогенная нуклеиновая кислота кодирует терапевтический полипептид. В некоторых вариантах осуществления экзогенная нуклеиновая кислота кодирует антитело. В некоторых вариантах осуществления экзогенная нуклеиновая кислота кодирует фермент. В некоторых вариантах осуществления экзогенная нуклеиновая кислота кодирует цитокин. В некоторых вариантах осуществления экзогенная нуклеиновая кислота кодирует хемокин. В некоторых вариантах осуществления экзогенная нуклеиновая кислота кодирует слитый белок. .

[00130] Сконструированная клетка может представлять собой любой из типичных типов клеток, описанных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления сконструированная клетка представляет собой иммунную клетку. В некоторых вариантах осуществления сконструированная клетка представляет собой гемопоэтическую стволовую клетку (ГСК). В некоторых вариантах осуществления сконструированная клетка представляет собой индуцированную плюрипотентную стволовую клетку (iPSC). В

некоторых вариантах осуществления сконструированная клетка представляет собой моноцит, макрофаг, тучную клетку, дендритную клетку или гранулоцит. В некоторых вариантах осуществления сконструированная клетка представляет собой моноцит. В некоторых вариантах осуществления сконструированная клетка представляет собой макрофаг. В некоторых вариантах осуществления сконструированная клетка представляет собой тучную клетку. В некоторых вариантах осуществления сконструированная клетка представляет собой дендритную клетку.

[00131] В некоторых вариантах осуществления сконструированная клетка представляет собой гранулоцит. В некоторых вариантах осуществления сконструированная клетка представляет собой лимфоцит. В некоторых вариантах осуществления сконструированная клетка представляет собой Т-клетку. В некоторых вариантах осуществления сконструированная клетка представляет собой Т-клетку CD4+. В некоторых вариантах осуществления сконструированная клетка представляет собой Т-клетку CD8+. В некоторых вариантах осуществления сконструированная клетка представляет собой Т-клетку памяти. В некоторых вариантах осуществления сконструированная клетка представляет собой В-клетку. В некоторых вариантах осуществления сконструированная клетка представляет собой плазматическую В-клетку. В некоторых вариантах осуществления сконструированная клетка представляет собой В-клетку памяти.

[00132] В некоторых вариантах осуществления сконструированная клетка является гомозиготной по HLA-B и гомозиготной по HLA-C. В некоторых вариантах осуществления аллель HLA-B выбран из любого из следующих аллелей HLA-B: HLA-B*07:02; HLA-B*08:01; HLA-B*44:02; HLA-B*35:01; HLA-B*40:01; HLA-B*57:01; HLA-B*14:02; HLA-B*15:01; HLA-B*13:02; HLA-B*44:03; HLA-B*38:01; HLA-B*18:01; HLA-B*44:03; HLA-B*51:01; HLA-B*49:01; HLA-B*15:01; HLA-B*18:01; HLA-B*27:05; HLA-B*35:03; HLA-B*18:01; HLA-B*52:01; HLA-B*51:01; HLA-B*37:01; HLA-B*53:01; HLA-B*55:01; HLA-B*44:02; HLA-B*44:03; HLA-B*35:02; HLA-B*15:01 и HLA-B*40:02.

[00133] В некоторых вариантах осуществления аллель HLA-C выбран из любого из следующих аллелей HLA-C: HLA-C*07:02; HLA-C*07:01; HLA-C*05:01; HLA-C*04:01 HLA-C*03:04; HLA-C*06:02; HLA-C*08:02; HLA-C*03:03; HLA-C*06:02; HLA-C*16:01; HLA-C*12:03; HLA-C*07:01; HLA-C*04:01; HLA-C*15:02; HLA-C*07:01; HLA-C*03:04; HLA-C*12:03; HLA-C*02:02; HLA-C*04:01; HLA-C*05:01; HLA-C*12:02; HLA-C*14:02; HLA-C*06:02; HLA-C*04:01; HLA-C*03:03; HLA-C*07:04; HLA-C*07:01; HLA-C*04:01; HLA-C*04:01; и HLA-C*02:02.

[00134] В некоторых вариантах осуществления аллель HLA-B выбран из любого из следующих аллелей HLA-B: HLA-B*07:02; HLA-B*08:01; HLA-B*44:02; HLA-B*35:01; HLA-B*40:01; HLA-B*57:01; HLA-B*14:02; HLA-B*15:01; HLA-B*13:02; HLA-B*44:03; HLA-B*38:01; HLA-B*18:01; HLA-B*44:03; HLA-B*51:01; HLA-B*49:01; HLA-B*15:01; HLA-B*18:01; HLA-B*27:05; HLA-B*35:03; HLA-B*18:01; HLA-B*52:01; HLA-B*51:01; HLA-B*37:01; HLA-B*53:01; HLA-B*55:01; HLA-B*44:02; HLA-B*44:03; HLA-B*35:02;

HLA-B*15:01; и HLA-B*40:02; и аллель HLA-C выбран из любого из следующих аллелей HLA-C: HLA-C*07:02; HLA-C*07:01; HLA-C*05:01; HLA-C*04:01 HLA-C*03:04; HLA-C*06:02; HLA-C*08:02; HLA-C*03:03; HLA-C*06:02; HLA-C*16:01; HLA-C*12:03; HLA-C*07:01; HLA-C*04:01; HLA-C*15:02; HLA-C*07:01; HLA-C*03:04; HLA-C*12:03; HLA-C*02:02; HLA-C*04:01; HLA-C*05:01; HLA-C*12:02; HLA-C*14:02; HLA-C*06:02; HLA-C*04:01; HLA-C*03:03; HLA-C*07:04; HLA-C*07:01; HLA-C*04:01; HLA-C*04:01; и HLA-C*02:02.

[00135] В некоторых вариантах осуществления сконструированная клетка является гомозиготной по HLA-B и гомозиготной по HLA-C, а аллели HLA-B и HLA-C выбраны из любого из следующих аллелей HLA-B и HLA-C: HLA-B*07:02 и HLA-C*07:02; HLA-B*08:01 и HLA-C*07:01; HLA-B*44:02 и HLA-C*05:01; HLA-B*35:01 и HLA-C*04:01; HLA-B*40:01 и HLA-C*03:04; HLA-B*57:01 и HLA-C*06:02; HLA-B*14:02 и HLA-C*08:02; HLA-B*15:01 и HLA-C*03:03; HLA-B*13:02 и HLA-C*06:02; HLA-B*44:03 и HLA-C*16:01; HLA-B*38:01 и HLA-C*12:03; HLA-B*18:01 и HLA-C*07:01; HLA-B*44:03 и HLA-C*04:01; HLA-B*51:01 и HLA-C*15:02; HLA-B*49:01 и HLA-C*07:01; HLA-B*15:01 и HLA-C*03:04; HLA-B*18:01 и HLA-C*12:03; HLA-B*27:05 и HLA-C*02:02; HLA-B*35:03 и HLA-C*04:01; HLA-B*18:01 и HLA-C*05:01; HLA-B*52:01 и HLA-C*12:02; HLA-B*51:01 и HLA-C*14:02; HLA-B*37:01 и HLA-C*06:02; HLA-B*53:01 и HLA-C*04:01; HLA-B*55:01 и HLA-C*03:03; HLA-B*44:02 и HLA-C*07:04; HLA-B*44:03 и HLA-C*07:01; HLA-B*35:02 и HLA-C*04:01; HLA-B*15:01 и HLA-C*04:01; и HLA-B*40:02 и HLA-C*02:02. В некоторых вариантах осуществления клетка является гомозиготной по HLA-B и гомозиготной по HLA-C, а аллели HLA-B и HLA-C представляют собой HLA-B*07:02 и HLA-C*07:02. В некоторых вариантах осуществления клетка является гомозиготной по HLA-B и гомозиготной по HLA-C, а аллели HLA-B и HLA-C представляют собой HLA-B*08:01 и HLA-C*07:01. В некоторых вариантах осуществления клетка является гомозиготной по HLA-B и гомозиготной по HLA-C, а аллели HLA-B и HLA-C представляют собой HLA-B*44:02 и HLA-C*05:01. В некоторых вариантах осуществления клетка является гомозиготной по HLA-B и гомозиготной по HLA-C, а аллели HLA-B и HLA-C представляют собой HLA-B*35:01 и HLA-C*04:01.

[00136] В некоторых вариантах осуществления предложена фармацевтическая композиция, содержащая любую из описанных в данном документе сконструированных клеток. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит популяцию любой из описанных в данном документе сконструированных клеток. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит популяцию сконструированных клеток, которая по меньшей мере на 65% отрицательна по данным проточной цитометрии. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит популяцию сконструированных клеток, которая по меньшей мере на 70% отрицательна по данным проточной цитометрии. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит популяцию сконструированных клеток, которая по меньшей мере на 80% отрицательна по данным проточной цитометрии.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит популяцию сконструированных клеток, которая по меньшей мере на 90% отрицательна по данным проточной цитометрии. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит популяцию сконструированных клеток, которая по меньшей мере на 91% отрицательна по данным проточной цитометрии. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит популяцию сконструированных клеток, которая по меньшей мере на 92% отрицательна по данным проточной цитометрии. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит популяцию сконструированных клеток, которая по меньшей мере на 93% отрицательна по данным проточной цитометрии. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит популяцию сконструированных клеток, которая по меньшей мере на 94% отрицательна по данным проточной цитометрии. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит популяцию сконструированных клеток, которая по меньшей мере на 95% является отрицательной по эндогенному белку ТКР по данным проточной цитометрии. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит популяцию сконструированных клеток, которая по меньшей мере на 97% является отрицательной по эндогенному белку ТКР по данным проточной цитометрии. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит популяцию сконструированных клеток, которая по меньшей мере на 98% является отрицательной по эндогенному белку ТКР по данным проточной цитометрии. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит популяцию сконструированных клеток, которая по меньшей мере на 99% является отрицательной по эндогенному белку ТКР по данным проточной цитометрии.

[00137] В некоторых вариантах осуществления предложены способы введения сконструированных клеток или фармацевтических композиций, описанных в данном документе, нуждающемуся в этом субъекту. В некоторых вариантах осуществления предложены способы введения сконструированных клеток или фармацевтических композиций, описанных в данном документе, субъекту в качестве терапии на основе АПК. В некоторых вариантах осуществления предложены способы введения сконструированных клеток или фармацевтических композиций, описанных в данном документе, субъекту для лечения рака. В некоторых вариантах осуществления предложены способы введения сконструированных клеток или фармацевтических композиций, описанных в данном документе, субъекту для лечения аутоиммунного заболевания. В некоторых вариантах осуществления предложены способы введения сконструированных клеток или фармацевтических композиций, описанных в данном документе, субъекту для лечения инфекционного заболевания.

Способы и композиции для снижения или устранения поверхностной экспрессии MHC класса II

[00138] В данном изобретении предложены способы и композиции для снижения или устранения поверхностной экспрессии белка MHC класса II на клетке по сравнению с

немодифицированной клеткой путем генетической модификации гена CIITA. Полученная генетически модифицированная клетка также может называться в настоящем документе как сконструированная клетка. В некоторых вариантах осуществления уже генетически модифицированная (или сконструированная) клетка может быть исходной клеткой для дальнейшей генетической модификации с применением способов или композиций, предложенных в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой аллогенную клетку. В некоторых вариантах осуществления клетка со сниженной экспрессией MHC класса II применима для терапии на основе адоптивного переноса клеток. В некоторых вариантах осуществления редактирование гена CIITA сочетается с дополнительными генетическими модификациями для получения клетки, подходящей для целей аллогенной трансплантации.

[00139] В некоторых вариантах осуществления способы включают снижение или устранение поверхностной экспрессии белка MHC класса II на поверхности клетки, включающие приведение клетки в контакт с композицией, содержащей CIITA-направленную РНК, содержащую направляющую последовательность, которая i) нацелена на геномную целевую последовательность CIITA, содержащую по меньшей мере один нуклеотид сайта сплайсинга, или ii) направляет РНК-направляемый ДНК-связывающий агент сделать разрез в геномной целевой последовательности CIITA, которая находится на расстоянии 5 нуклеотидов или менее от нуклеотида, граничащего с сайтом сплайсинга; где CIITA-направленную РНК нацелена на геномную целевую последовательность, содержащую по меньшей мере 10 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат chr16:10902171-10923242. В некоторых вариантах осуществления способы дополнительно включают приведение клетки в контакт с РНК-направляемым ДНК-связывающим агентом или нуклеиновой кислотой, кодирующей РНК-направляемый ДНК-связывающий агент. В некоторых вариантах осуществления РНК-направляемый ДНК-связывающий агент представляет собой Cas9. В некоторых вариантах осуществления РНК-направляемый ДНК-связывающий агент представляет собой Cas9 S. pyogenes. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК представляет собой РНК-направляемый Cas9 S. pyogenes. В некоторых вариантах осуществления РНК-направляемый ДНК-связывающий агент содержит домен дезаминазы. В некоторых вариантах осуществления РНК-направляемый ДНК-связывающий агент содержит дезаминазу APOBEC3A (A3A) и РНК-направляемую никазу. В некоторых вариантах осуществления экспрессия белка MHC класса II на поверхности клетки (*m.e.* сконструированной клетки) тем самым снижается. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит направляющую последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1-101.

[00140] В некоторых вариантах осуществления способы включают получение сконструированной клетки, в которой снижена или устранена поверхностная экспрессия белка MHC класса II по сравнению с немодифицированной клеткой, включая приведение клетки в контакт с композицией, содержащей CIITA-направленную РНК, содержащую направляющую последовательность, которая i) нацелена на геномную целевую

последовательность CIITA, содержащую по меньшей мере один нуклеотид сайта сплайсинга, или ii) направляет РНК-направляемый ДНК-связывающий агент сделать разрез в геномной целевой последовательности CIITA, которая находится на расстоянии 5 нуклеотидов или менее от нуклеотида, граничащего с сайтом сплайсинга; где CIITA-направленную РНК нацелена на геномную целевую последовательность, содержащую по меньшей мере 10 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат chr16:10902171-10923242. В некоторых вариантах осуществления способы дополнительно включают приведение клетки в контакт с РНК-направляемым ДНК-связывающим агентом или нуклеиновой кислотой, кодирующей РНК-направляемый ДНК-связывающий агент. В некоторых вариантах осуществления РНК-направляемый ДНК-связывающий агент представляет собой Cas9. В некоторых вариантах осуществления РНК-направляемый ДНК-связывающий агент представляет собой Cas9 S. pyogenes. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК представляет собой РНК-направляемый Cas9 S. pyogenes. В некоторых вариантах осуществления РНК-направляемый ДНК-связывающий агент содержит деаминазную область. В некоторых вариантах осуществления РНК-направляемый ДНК-связывающий агент содержит дезаминазу APOBEC3A (A3A) и РНК-направляемую никазу. В некоторых вариантах осуществления экспрессия белка MHC класса II на поверхности клетки (*m.e.* сконструированной клетки) тем самым снижается. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит направляющую последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1-101.

[00141] В некоторых вариантах осуществления способы включают генетическую модификацию клетки для снижения или устранения поверхностной экспрессии белка MHC класса II, включая приведение клетки в контакт с композицией, содержащей CIITA-направленную РНК, содержащую направляющую последовательность, которая i) нацелена на геномную целевую последовательность CIITA, содержащую по меньшей мере один нуклеотид сайта сплайсинга, или ii) направляет РНК-направляемый ДНК-связывающий агент сделать разрез в геномной целевой последовательности CIITA, которая находится на расстоянии 5 нуклеотидов или менее от нуклеотида, граничащего с сайтом сплайсинга; где CIITA-направленную РНК нацелена на геномную целевую последовательность, содержащую по меньшей мере 10 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат chr16:10902171-10923242. В некоторых вариантах осуществления способы дополнительно включают приведение клетки в контакт с РНК-направляемым ДНК-связывающим агентом или нуклеиновой кислотой, кодирующей РНК-направляемый ДНК-связывающий агент. В некоторых вариантах осуществления РНК-направляемый ДНК-связывающий агент представляет собой Cas9. В некоторых вариантах осуществления РНК-направляемый ДНК-связывающий агент представляет собой Cas9 S. pyogenes. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК представляет собой РНК-направляемый Cas9 S. pyogenes. В некоторых вариантах осуществления РНК-направляемый ДНК-связывающий агент содержит деаминазную область. В некоторых вариантах осуществления РНК-направляемый ДНК-связывающий агент содержит дезаминазу APOBEC3A (A3A) и РНК-

направляемую никазу. В некоторых вариантах осуществления экспрессия белка MHC класса II на поверхности клетки (*т.е.* сконструированной клетки) тем самым снижается. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит направляющую последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1-101.

[00142] В некоторых вариантах осуществления способы включают инактивацию сайта сплайсинга в CIITA, включая приведение клетки в контакт с композицией, содержащей CIITA-направленную РНК, содержащую направляющую последовательность, которая i) нацелена на геномную целевую последовательность CIITA, содержащую по меньшей мере один нуклеотид сайта сплайсинга, или ii) направляет РНК-направляемый ДНК-связывающий агент сделать разрез в геномной целевой последовательности CIITA, которая находится на расстоянии 5 нуклеотидов или менее от нуклеотида, граничащего с сайтом сплайсинга; где CIITA-направленную РНК нацелена на геномную целевую последовательность, содержащую по меньшей мере 10 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат chr16:10902171-10923242. В некоторых вариантах осуществления способы дополнительно включают приведение клетки в контакт с РНК-направляемым ДНК-связывающим агентом или нуклеиновой кислотой, кодирующей РНК-направляемый ДНК-связывающий агент. В некоторых вариантах осуществления РНК-направляемый ДНК-связывающий агент представляет собой Cas9. В некоторых вариантах осуществления РНК-направляемый ДНК-связывающий агент представляет собой Cas9 S. pyogenes. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК представляет собой РНК-направляемый Cas9 S. pyogenes. В некоторых вариантах осуществления РНК-направляемый ДНК-связывающий агент содержит деаминазную область. В некоторых вариантах осуществления РНК-направляемый ДНК-связывающий агент содержит дезаминазу APOBEC3A (A3A) и РНК-направляемую никазу. В некоторых вариантах осуществления экспрессия белка MHC класса II на поверхности клетки (*т.е.* сконструированной клетки) тем самым снижается. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит направляющую последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1-101.

[00143] В некоторых вариантах осуществления способы включают индукцию DSB или одноцепочечного разрыва (SSB) в CIITA, включая приведение клетки в контакт с композицией, содержащей CIITA-направленную РНК, содержащую направляющую последовательность, которая i) нацелена на геномную целевую последовательность CIITA, содержащую по меньшей мере один нуклеотид сайта сплайсинга, или ii) направляет РНК-направляемый ДНК-связывающий агент сделать разрез в геномной целевой последовательности CIITA, которая находится на расстоянии 5 нуклеотидов или менее от нуклеотида, граничащего с сайтом сплайсинга; где CIITA-направленную РНК нацелена на геномную целевую последовательность, содержащую по меньшей мере 10 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат chr16:10902171-10923242. В некоторых вариантах осуществления способы дополнительно включают приведение клетки в контакт с РНК-направляемым ДНК-связывающим агентом или нуклеиновой

кислотой, кодирующей РНК-направляемый ДНК-связывающий агент. В некоторых вариантах осуществления РНК-направляемый ДНК-связывающий агент представляет собой Cas9. В некоторых вариантах осуществления РНК-направляемый ДНК-связывающий агент представляет собой Cas9 S. pyogenes. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК представляет собой РНК-направляемый Cas9 S. pyogenes. В некоторых вариантах осуществления РНК-направляемый ДНК-связывающий агент содержит деаминазную область. В некоторых вариантах осуществления РНК-направляемый ДНК-связывающий агент содержит дезаминазу APOBEC3A (A3A) и РНК-направляемую никазу. В некоторых вариантах осуществления экспрессия белка MHC класса II на поверхности клетки (*m.e.* сконструированной клетки) тем самым снижается. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит направляющую последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1-101.

[00144] В некоторых вариантах осуществления способы включают снижение экспрессии белка CIITA в клетке, включая доставку композиции в клетку, включая приведение клетки в контакт с композицией, содержащей CIITA-направленную РНК, содержащую направляющую последовательность, которая i) нацелена на геномную целевую последовательность CIITA, содержащую по меньшей мере один нуклеотид сайта сплайсинга, или ii) направляет РНК-направляемый ДНК-связывающий агент сделать разрез в геномной целевой последовательности CIITA, которая находится на расстоянии 5 нуклеотидов или менее от нуклеотида, граничащего с сайтом сплайсинга; где CIITA-направленную РНК нацелена на геномную целевую последовательность, содержащую по меньшей мере 10 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат chr16:10902171-10923242. В некоторых вариантах осуществления способы дополнительно включают приведение клетки в контакт с РНК-направляемым ДНК-связывающим агентом или нуклеиновой кислотой, кодирующей РНК-направляемый ДНК-связывающий агент. В некоторых вариантах осуществления РНК-направляемый ДНК-связывающий агент представляет собой Cas9. В некоторых вариантах осуществления РНК-направляемый ДНК-связывающий агент представляет собой Cas9 S. pyogenes. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК представляет собой РНК-направляемый Cas9 S. pyogenes. В некоторых вариантах осуществления РНК-направляемый ДНК-связывающий агент содержит деаминазную область. В некоторых вариантах осуществления РНК-направляемый ДНК-связывающий агент содержит дезаминазу APOBEC3A (A3A) и РНК-направляемую никазу. В некоторых вариантах осуществления экспрессия белка MHC класса II на поверхности клетки (*m.e.* сконструированной клетки) тем самым снижается. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит направляющую последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1-101.

[00145] В некоторых вариантах осуществления способы снижения экспрессии белка MHC класса II на поверхности клетки включают приведение клетки в контакт с любой одной или несколькими CIITA-направленными РНК, описанными в данном документе. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит

направляющую последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1-101.

[00146] В некоторых вариантах осуществления предложены композиции, содержащие CIITA-направленную РНК, содержащую направляющую последовательность, которая i) нацелена на геномную целевую последовательность CIITA, содержащую по меньшей мере один нуклеотид сайта сплайсинга, или ii) направляет РНК-направляемый ДНК-связывающий агент сделать разрез в геномной целевой последовательности CIITA, которая находится на расстоянии 5 нуклеотидов или менее от нуклеотида, граничащего с сайтом сплайсинга; где CIITA-направленная РНК нацелена на геномную целевую последовательность, содержащую по меньшей мере 10 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат chr16:10902171-10923242. В некоторых вариантах осуществления композиция дополнительно содержит РНК-направляемый ДНК-связывающий агент или нуклеиновую кислоту, кодирующую РНК-направляемый ДНК-связывающий агент. В некоторых вариантах осуществления композиция содержит РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, который представляет собой Cas9. В некоторых вариантах осуществления РНК-направляемый ДНК-связывающий агент представляет собой Cas9 S. pyogenes. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК представляет собой РНК-направляемый Cas9 S. pyogenes. В некоторых вариантах осуществления РНК-направляемый ДНК-связывающий агент содержит деаминазную область. В некоторых вариантах осуществления РНК-направляемый ДНК-связывающий агент содержит дезаминазу APOBEC3A (A3A) и РНК-направляемую никазу. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит направляющую последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1-101.

[00147] В некоторых вариантах осуществления композиция дополнительно содержит ингибитор урацилгликозилазы (UGI). В некоторых вариантах осуществления композиция содержит РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, который вызывает превращение цитозина (C) в тимин (T) в геномной целевой последовательности CIITA. В некоторых вариантах осуществления композиция содержит РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, который вызывает превращение аденозина (A) в гуанин (G) в геномной целевой последовательности CIITA.

[00148] В некоторых вариантах осуществления предложена сконструированная клетка, полученная способами, описанными в данном документе. В некоторых вариантах осуществления сконструированная клетка, полученная способами и композициями, описанными в данном документе, представляет собой аллогенную клетку. В некоторых вариантах осуществления способы позволяют получить композицию, содержащую сконструированную клетку со сниженной экспрессией MHC класса II. В некоторых вариантах осуществления способы позволяют получить композицию, содержащую сконструированную клетку со сниженной экспрессией белка CIITA. В некоторых вариантах осуществления способы позволяют получить композицию, содержащую сконструированную клетку со сниженными уровнями CIITA в ядре клетки. В некоторых вариантах осуществления способы позволяют получить композицию, содержащую

сконструированную клетку, которая экспрессирует усеченную форму белка CIITA. В некоторых вариантах осуществления способы позволяют получить композицию, содержащую сконструированную клетку, которая не продуцирует обнаруживаемый белок CIITA. В некоторых вариантах осуществления сконструированная клетка имеет сниженную экспрессию MHC класса II, сниженный уровень белка CIITA и/или сниженный уровень CIITA в ядре клетки по сравнению с немодифицированной клеткой. В некоторых вариантах осуществления сконструированная клетка, полученная способами, описанными в данном документе, вызывает сниженную ответ CD4+ Т-клеток по сравнению с немодифицированной клеткой, как было измерено в анализе клеточной культуры in vitro, содержащем CD4+ Т-клетки.

[00149] В некоторых вариантах осуществления предложена сконструированная клетка, полученная с помощью способов или композиций, описанных в данном документе, где в клетке снижена или устранена поверхностная экспрессия белка MHC класса II, и где клетка содержит генетическую модификацию, включающую модификацию по меньшей мере одного нуклеотида акцепторного сайта сплайсинга. В некоторых вариантах осуществления предложена сконструированная клетка, полученная с помощью способов или композиций, описанных в данном документе, где в клетке снижена или устранена поверхностная экспрессия белка MHC класса II, и где клетка содержит генетическую модификацию, включающую модификацию по меньшей мере одного нуклеотида донорного сайта сплайсинга.

[00150] В некоторых вариантах осуществления предложена сконструированная клетка, полученная с помощью способов или композиций, описанных в данном документе, где в клетке снижена или устранена поверхностная экспрессия белка MHC класса II, и где клетка содержит генетическую модификацию, содержащую по меньшей мере 5 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат chr16: 10902171-10923242. В некоторых вариантах осуществления предложена сконструированная клетка, полученная с помощью способов или композиций, описанных в данном документе, где в клетке снижена или устранена поверхностная экспрессия белка MHC класса II, и где клетка содержит генетическую модификацию, содержащую по меньшей мере 10 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат chr16: 10902171-10923242. В некоторых вариантах осуществления предложена сконструированная клетка, полученная с помощью способов или композиций, описанных в данном документе, где в клетке снижена или устранена поверхностная экспрессия белка MHC класса II, и где клетка содержит генетическую модификацию, содержащую по меньшей мере одну замену C на T или по меньшей мере одну замену A на G в пределах геномных координат chr16: 10902171-10923242.

[00151] В некоторых вариантах осуществления предложена сконструированная клетка, полученная с помощью способов или композиций, описанных в данном документе, где в клетке снижена или устранена поверхностная экспрессия белка MHC класса II, и где клетка содержит генетическую модификацию, содержащую по меньшей

мере один нуклеотид сайта сплайсинга в пределах геномных координат chr16:10903873-chr:10923242. В некоторых вариантах осуществления предложена сконструированная клетка, полученная с помощью способов или композиций, описанных в данном документе, где в клетке снижена или устранена поверхностная экспрессия белка MHC класса II, и где клетка содержит генетическую модификацию, содержащую по меньшей мере один нуклеотид сайта сплайсинга в пределах геномных координат chr:16:10906485-chr:10923242. В некоторых вариантах осуществления предложена сконструированная клетка, полученная с помощью способов или композиций, описанных в данном документе, где в клетке снижена или устранена поверхностная экспрессия белка MHC класса II, и где клетка содержит генетическую модификацию, содержащую по меньшей мере один нуклеотид сайта сплайсинга в пределах геномных координат chr16:10908130-chr:10923242.

[00152] В некоторых вариантах осуществления композиции, описанные в настоящем документе, дополнительно содержат фармацевтически приемлемый носитель. В некоторых вариантах осуществления представлена клетка, продуцируемая композициями, описанными в настоящем документе, включающая фармацевтически приемлемый носитель. В некоторых вариантах осуществления предлагаются композиции, содержащие описанные в настоящем документе клетки.

1. CIITA-направленные РНК

[00153] Способы и композиции, предложенные в данном документе, описывают CIITA-направленные РНК, применимые для снижения экспрессии белка MHC класса II на поверхности клетки. В некоторых вариантах осуществления такие направляющие РНК направляют РНК-направляемый ДНК-связывающий агент к геномной целевой последовательности CIITA и могут упоминаться в данном документе как «CIITA-направленные РНК». В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК направляет РНК-направляемый ДНК-связывающий агент к геномной целевой последовательности CIITA человека. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит направляющую последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1-101.

[00154] В некоторых вариантах осуществления способы и композиции, описанные в данном документе, содержат CIITA-направленную РНК, содержащую направляющую последовательность, которая нацелена на геномную целевую последовательность CIITA, содержащую по меньшей мере один нуклеотид сайта сплайсинга, где CIITA-направленная РНК нацелена на геномную целевую последовательность CIITA, содержащую по меньшей мере 10 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат chr16:10902171-10923242. В некоторых вариантах осуществления способы и композиции, описанные в данном документе, содержат CIITA-направленную РНК, содержащую направляющую последовательность, которая нацелена на геномную целевую последовательность CIITA, содержащую по меньшей мере один нуклеотид сайта сплайсинга, где CIITA-направленная РНК нацелена на геномную целевую последовательность CIITA, содержащую по меньшей

мере один нуклеотид в пределах геномных координат chr16:10903873-chr:10923242. В некоторых вариантах осуществления способы и композиции, описанные в данном документе, содержат CIITA-направленную РНК, содержащую направляющую последовательность, которая нацелена на геномную целевую последовательность CIITA, содержащую по меньшей мере один нуклеотид сайта сплайсинга, где CIITA-направленная РНК нацелена на геномную целевую последовательность CIITA, содержащую по меньшей мере один нуклеотид в пределах геномных координат chr:16:10906485-chr:10923242. В некоторых вариантах осуществления способы и композиции, описанные в данном документе, содержат CIITA-направленную РНК, содержащую направляющую последовательность, которая нацелена на геномную целевую последовательность CIITA, содержащую по меньшей мере один нуклеотид сайта сплайсинга, где CIITA-направленная РНК нацелена на геномную целевую последовательность CIITA, содержащую по меньшей мере один нуклеотид в пределах геномных координат chr16:10908130-chr:10923242.

[00155] В некоторых вариантах осуществления способы и композиции, описанные в данном документе, содержат CIITA-направленную РНК, содержащую направляющую последовательность, которая нацелена на геномную целевую последовательность CIITA, содержащую по меньшей мере один нуклеотид акцепторного сайта сплайсинга. В некоторых вариантах осуществления один нуклеотид акцепторного сайта сплайсинга представляет собой A. В некоторых вариантах осуществления один нуклеотид акцепторного сайта сплайсинга представляет собой G. В некоторых вариантах осуществления один нуклеотид представляет собой нуклеотид, граничащий с сайтом сплайсинга акцепторного сайта сплайсинга. В некоторых вариантах осуществления способы и композиции, описанные в данном ДОНОРНАЯ, содержат CIITA-направленную РНК, содержащую направляющую последовательность, которая нацелена на геномную целевую последовательность CIITA, содержащую по меньшей мере один нуклеотид донорного сайта сплайсинга. В некоторых вариантах осуществления один нуклеотид донорного сайта сплайсинга представляет собой G. В некоторых вариантах осуществления один нуклеотид донорного сайта сплайсинга представляет собой U/T. В некоторых вариантах осуществления один нуклеотид представляет собой нуклеотид, граничащий с сайтом сплайсинга донорного сайта сплайсинга.

[00156] В некоторых вариантах осуществления способы и композиции, описанные в данном документе, содержат CIITA-направленную РНК, содержащую направляющую последовательность, которая направляет РНК-направляемый ДНК-связывающий агент сделать разрез в гене CIITA, который находится на расстоянии 5 нуклеотидов или менее от нуклеотида, граничащего с сайтом сплайсинга, где CIITA-направленная РНК нацелена на геномную целевую последовательность CIITA, содержащую по меньшей мере 10 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат chr16:10902171-10923242. В некоторых вариантах осуществления способы и композиции, описанные в данном документе, содержат CIITA-направленную РНК, содержащую направляющую последовательность, которая направляет РНК-направляемый ДНК-связывающий агент

сделать разрез в гене CIITA, который находится на расстоянии 5 нуклеотидов или менее от нуклеотида, граничащего с сайтом сплайсинга, где CIITA-направленная РНК нацелена на геномную целевую последовательность CIITA, содержащую по меньшей мере один нуклеотид в пределах геномных координат chr16:10903873-chr:10923242. В некоторых вариантах осуществления способы и композиции, описанные в данном документе, содержат CIITA-направленную РНК, содержащую направляющую последовательность, которая направляет РНК-направляемый ДНК-связывающий агент сделать разрез в гене CIITA, который находится на расстоянии 5 нуклеотидов или менее от нуклеотида, граничащего с сайтом сплайсинга, где CIITA-направленная РНК нацелена на геномную целевую последовательность CIITA, содержащую по меньшей мере один нуклеотид в пределах геномных координат chr:16:10906485-chr:10923242. В некоторых вариантах осуществления способы и композиции, описанные в данном документе, содержат CIITA-направленную РНК, содержащую направляющую последовательность, которая направляет РНК-направляемый ДНК-связывающий агент сделать разрез в гене CIITA, который находится на расстоянии 5 нуклеотидов или менее от нуклеотида, граничащего с сайтом сплайсинга, где CIITA-направленная РНК нацелена на геномную целевую последовательность CIITA, содержащую по меньшей мере один нуклеотид в пределах геномных координат chr16:10908130-chr:10923242.

[00157] В некоторых вариантах осуществления способы и композиции, описанные в данном документе, содержат CIITA-направленную РНК, содержащую направляющую последовательность, которая направляет РНК-направляемый ДНК-связывающий агент сделать разрез в гене CIITA, который находится на расстоянии 5 нуклеотидов или менее от нуклеотида, граничащего с акцепторным сайтом сплайсинга, где CIITA-направленная РНК нацелена на геномную целевую последовательность CIITA, содержащую по меньшей мере 10 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат chr16:10902171-10923242. В некоторых вариантах осуществления способы и композиции, описанные в данном документе, содержат CIITA-направленную РНК, содержащую направляющую последовательность, которая направляет РНК-направляемый ДНК-связывающий агент сделать разрез в гене CIITA, который находится на расстоянии 5 нуклеотидов или менее от нуклеотида, граничащего с донорным сайтом сплайсинга, где CIITA-направленная РНК нацелена на геномную целевую последовательность CIITA, содержащую по меньшей мере 10 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат chr16:10902171-10923242.

[00158] В некоторых вариантах осуществления способы и композиции описывают CIITA-направленную РНК, которая направляет РНК-направляемый ДНК-связывающий агент сделать разрез в геномной целевой последовательности CIITA, которая находится на расстоянии 5 нуклеотидов или менее от нуклеотида, граничащего с сайтом сплайсинга. В вариантах осуществления, в которых РНК-направляемый ДНК-разрезающий агент представляет собой Cas9, разрез или «сайт разреза» происходит в третьем основании от последовательности мотива, прилегающего к протоспейсеру (PAM).

[00159] В некоторых вариантах осуществления способы и композиции, описанные

в данном документе, содержат CIITA-направленную РНК, содержащую направляющую последовательность, которая направляет РНК-направляемый ДНК-связывающий агент сделать разрез в гене CIITA, который находится на расстоянии 5 нуклеотидов или менее от нуклеотида, граничащего с акцепторным сайтом сплайсинга, где сайт разреза расположен на 3'-конце нуклеотида, граничащего с акцепторным сайтом сплайсинга. В некоторых вариантах осуществления способы и композиции, описанные в данном документе, содержат CIITA-направленную РНК, содержащую направляющую последовательность, которая направляет РНК-направляемый ДНК-связывающий агент сделать разрез в гене CIITA, который находится на расстоянии 5 нуклеотидов или менее от нуклеотида, граничащего с акцепторным сайтом сплайсинга, где разрез представляет собой 5'-конец нуклеотида, граничащего с акцепторным сайтом сплайсинга.

[00160] В некоторых вариантах осуществления способы и композиции, описанные в данном документе, содержат CIITA-направленную РНК, содержащую направляющую последовательность, которая направляет РНК-направляемый ДНК-связывающий агент сделать разрез в гене CIITA, который находится на расстоянии 5 нуклеотидов или менее от нуклеотида, граничащего с донорным сайтом сплайсинга, где разрез представляет собой 3'-конец нуклеотида, граничащего с донорным сайтом сплайсинга. В некоторых вариантах осуществления способы и композиции, описанные в данном документе, содержат CIITA-направленную РНК, содержащую направляющую последовательность, которая направляет РНК-направляемый ДНК-связывающий агент сделать разрез в гене CIITA, который находится на расстоянии 5 нуклеотидов или менее от нуклеотида, граничащего с донорным сайтом сплайсинга, где разрез представляет собой 5'-конец нуклеотида, граничащего с донорным сайтом сплайсинга.

[00161] В некоторых вариантах осуществления направленная CIITA содержит направляющую последовательность, которая направляет РНК-направляемый ДНК-связывающий агент сделать разрез в гене CIITA, который находится на расстоянии 4 нуклеотидов или менее от нуклеотида, граничащего с акцепторным сайтом сплайсинга. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит направляющую последовательность, которая направляет РНК-направляемый ДНК-связывающий агент сделать разрез в гене CIITA, который находится на расстоянии 3 нуклеотидов или менее от нуклеотида, граничащего с акцепторным сайтом сплайсинга. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит направляющую последовательность, которая направляет РНК-направляемый ДНК-связывающий агент сделать разрез в гене CIITA, который находится на расстоянии 2 нуклеотидов или менее от нуклеотида, граничащего с акцепторным сайтом сплайсинга. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит направляющую последовательность, которая направляет РНК-направляемый ДНК-связывающий агент сделать разрез в гене CIITA, который находится на расстоянии 1 нуклеотида или менее от нуклеотида, граничащего с акцепторным сайтом сплайсинга. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит направляющую последовательность, которая направляет

РНК-направляемый ДНК-связывающий агент сделать разрез в гене CIITA по нуклеотиду, граничащему с акцепторным сайтом сплайсинга.

[00162] В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит направляющую последовательность, которая направляет РНК-направляемый ДНК-связывающий агент сделать разрез в гене CIITA, который находится на расстоянии 4 нуклеотидов или менее от нуклеотида, граничащего с донорным сайтом сплайсинга. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит направляющую последовательность, которая направляет РНК-направляемый ДНК-связывающий агент сделать разрез в гене CIITA, который находится на расстоянии 3 нуклеотидов или менее от нуклеотида, граничащего с донорным сайтом сплайсинга. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит направляющую последовательность, которая направляет РНК-направляемый ДНК-связывающий агент сделать разрез в гене CIITA, который находится на расстоянии 2 нуклеотидов или менее от нуклеотида, граничащего с донорным сайтом сплайсинга. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит направляющую последовательность, которая направляет РНК-направляемый ДНК-связывающий агент сделать разрез в гене CIITA, который находится на расстоянии 1 нуклеотид или менее от нуклеотида, граничащего с донорным сайтом сплайсинга. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит направляющую последовательность, которая направляет РНК-направляемый ДНК-связывающий агент сделать разрез в гене CIITA по нуклеотиду, граничащему с донорным сайтом сплайсинга.

[00163] В некоторых вариантах осуществления предложена композиция, содержащая CIITA-направленную РНК, описанную в данном документе, и РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, или нуклеиновую кислоту, кодирующую РНК-направляемый ДНК-связывающий агент.

[00164] В некоторых вариантах осуществления предложена композиция, содержащая CIITA-одиночную направляющую РНК (онРНК), содержащую направляющую последовательность, которая i) нацелена на геномную целевую последовательность CIITA, содержащую по меньшей мере один нуклеотид сайта сплайсинга, или ii) направляет РНК-направляемый ДНК-связывающий агент сделать разрез в геномной целевой последовательности CIITA, которая находится на расстоянии 5 нуклеотидов или менее от нуклеотида, граничащего с сайтом сплайсинга; где CIITA-направленная РНК нацелена на геномную целевую последовательность, содержащую по меньшей мере 10 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат chr16:10902171-10923242. В некоторых вариантах осуществления предложена композиция, содержащая CIITA-онРНК, описанную в данном документе, и РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, или нуклеиновую кислоту, кодирующую РНК-направляемый ДНК-связывающий агент.

[00165] В некоторых вариантах осуществления предложена композиция, содержащая CIITA-двойную направляющую РНК (днРНК), содержащую направляющую

последовательность, которая i) нацелена на геномную целевую последовательность CIITA, содержащую по меньшей мере один нуклеотид сайта сплайсинга, или ii) направляет РНК-направляемый ДНК-связывающий агент сделать разрез в геномной целевой последовательности CIITA, которая находится на расстоянии 5 нуклеотидов или менее от нуклеотида, граничащего с сайтом сплайсинга; где CIITA-направленная РНК нацелена на геномную целевую последовательность, содержащую по меньшей мере 10 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат chr16:10902171-10923242. В некоторых вариантах осуществления предложена композиция, содержащая CIITA-днРНК, описанную в данном документе, и РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, или нуклеиновую кислоту, кодирующую РНК-направляемый ДНК-связывающий агент.

[00166] Типичные CIITA-направленные последовательности показаны ниже в **Таблице 1** (SEQ ID NO: 1-101 с соответствующими направляющими последовательностями РНК SEQ ID NO: 200-300 и 301-401).

[00167] **Таблица 1. Типовые CIITA-направленные последовательности.**

Идентификатор направляющей последти	**SEQ ID NO к направляющей последовательности**	**Направляющая последовательность**	**Примерная Mod-последовательность** (четыре концевых остатка U являются необязательными и могут включать 0, 1, 2, 3, 4 или большее количество остатков U) (SEQ ID NO: 200-300)	**Типовая полная последовательность** (SEQ ID NO: 301-401)	**Геномные координаты**
G018021	1	UCCUACCU GUCAGAGC CCCA	mU*mC*mC*UACCU GUCAGAGCCCCAG UUUUAGAmGmCmU mAmGmAmAmAmU mAmGmCAAGUUAA AAUAAGGCUAGUC CGUUAUCAmAmCm UmUmGmAmAmAmA mAmGmUmGmGmCm AmCmCmGmAmGmU mCmGmGmUmGmCm U*mU*mU*mU	UCCUACCUGU CAGAGCCCCA GUUUUAGAGC UAGAAAUAGC AAGUUAAAAU AAGGCUAGUC CGUUAUCAAC UUGAAAAAGU GGCACCGAGU CGGUGCUUUU	chr16:108 77360-10877380
G018022	2	GAGCCCCA AGGUAAAA AGGC	mG*mA*mG*CCCCA AGGUAAAAAGGCG UUUUAGAmGmCmU	GAGCCCCAAG GUAAAAAGGC GUUUUAGAGC	chr16:108 77372-10877392

			mAmGmAmAmAmU mAmGmCAAGUUAA AAUAAGGCUAGUC CGUUAUCAmAmCm UmUmGmAmAmAmA mAmGmUmGmGmCm AmCmCmGmAmGmU mCmGmGmUmGmCm U*mU*mU*mU	UAGAAAUAGC AAGUUAAAAU AAGGCUAGUC CGUUAUCAAC UUGAAAAAGU GGCACCGAGU CGGUGCUUUU	
G018023	3	AGCCCCAA GGUAAAAA GGCC	mA*mG*mC*CCCAA GGUAAAAAGGCCG UUUUAGAmGmCmU mAmGmAmAmAmU mAmGmCAAGUUAA AAUAAGGCUAGUC CGUUAUCAmAmCm UmUmGmAmAmAmA mAmGmUmGmGmCm AmCmCmGmAmGmU mCmGmGmUmGmCm U*mU*mU*mU	AGCCCCAAGG UAAAAAGGCC GUUUUAGAGC UAGAAAUAGC AAGUUAAAAU AAGGCUAGUC CGUUAUCAAC UUGAAAAAGU GGCACCGAGU CGGUGCUUUU	chr16:108 77373- 10877393
G018024	4	UUUCCCGG CCUUUUUA CCUU	mU*mU*mU*CCCGG CCUUUUUACCUUG UUUUAGAmGmCmU mAmGmAmAmAmU mAmGmCAAGUUAA AAUAAGGCUAGUC CGUUAUCAmAmCm UmUmGmAmAmAmA mAmGmUmGmGmCm AmCmCmGmAmGmU mCmGmGmUmGmCm U*mU*mU*mU	UUUCCCGGCC UUUUUACCUU GUUUUAGAGC UAGAAAUAGC AAGUUAAAAU AAGGCUAGUC CGUUAUCAAC UUGAAAAAGU GGCACCGAGU CGGUGCUUUU	chr16:108 77379- 10877399
G018025	5	CUUUCCCG GCCUUUUU	mC*mU*mU*UCCCG GCCUUUUUACCUG	CUUUCCCGGC CUUUUUACCU	chr16:108 77380-

		ACCU	UUUUAGAmGmCmU mAmGmAmAmAmU mAmGmCAAGUUAA AAUAAGGCUAGUC CGUUAUCAmAmCm UmUmGmAmAmAmA mAmGmUmGmGmCm AmCmCmGmAmGmU mCmGmGmUmGmCm U*mU*mU*mU	GUUUUAGAGC UAGAAAUAGC AAGUUAAAAU AAGGCUAGUC CGUUAUCAAC UUGAAAAAGU GGCACCGAGU CGGUGCUUUU	10877400
G018026	6	ACACUGUG AGCUGCCU GGGA	mA*mC*mA*CUGUG AGCUGCCUGGGAG UUUUAGAmGmCmU mAmGmAmAmAmU mAmGmCAAGUUAA AAUAAGGCUAGUC CGUUAUCAmAmCm UmUmGmAmAmAmA mAmGmUmGmGmCm AmCmCmGmAmGmU mCmGmGmUmGmCm U*mU*mU*mU	ACACUGUGAG CUGCCUGGGA GUUUUAGAGC UAGAAAUAGC AAGUUAAAAU AAGGCUAGUC CGUUAUCAAC UUGAAAAAGU GGCACCGAGU CGGUGCUUUU	chr16:108 95275- 10895295
G018027	7	CACACUGU GAGCUGCC UGGG	mC*mA*mC*ACUGU GAGCUGCCUGGGG UUUUAGAmGmCmU mAmGmAmAmAmU mAmGmCAAGUUAA AAUAAGGCUAGUC CGUUAUCAmAmCm UmUmGmAmAmAmA mAmGmUmGmGmCm AmCmCmGmAmGmU mCmGmGmUmGmCm U*mU*mU*mU	CACACUGUGA GCUGCCUGGG GUUUUAGAGC UAGAAAUAGC AAGUUAAAAU AAGGCUAGUC CGUUAUCAAC UUGAAAAAGU GGCACCGAGU CGGUGCUUUU	chr16:108 95276- 10895296
G018028	8	GUGGCACA	mG*mU*mG*GCACA	GUGGCACACU	chr16:108

		CUGUGAGC UGCC	CUGUGAGCUGCCG UUUUAGAmGmCmU mAmGmAmAmAmU mAmGmCAAGUUAA AAUAAGGCUAGUC CGUUAUCAmAmCm UmUmGmAmAmAmA mAmGmUmGmGmCm AmCmCmGmAmGmU mCmGmGmUmGmCm U*mU*mU*mU	GUGAGCUGCC GUUUUAGAGC UAGAAAUAGC AAGUUAAAAU AAGGCUAGUC CGUUAUCAAC UUGAAAAAGU GGCACCGAGU CGGUGCUUUU	95280- 10895300
G018029	9	GAGAUUGA GCUCUACU CAGG	mG*mA*mG*AUUGA GCUCUACUCAGGG UUUUAGAmGmCmU mAmGmAmAmAmU mAmGmCAAGUUAA AAUAAGGCUAGUC CGUUAUCAmAmCm UmUmGmAmAmAmA mAmGmUmGmGmCm AmCmCmGmAmGmU mCmGmGmUmGmCm U*mU*mU*mU	GAGAUUGAGC UCUACUCAGG GUUUUAGAGC UAGAAAUAGC AAGUUAAAAU AAGGCUAGUC CGUUAUCAAC UUGAAAAAGU GGCACCGAGU CGGUGCUUUU	chr16:108 95409- 10895429
G018030	10	AGAUUGAG CUCUACUC AGGU	mA*mG*mA*UUGAG CUCUACUCAGGUG UUUUAGAmGmCmU mAmGmAmAmAmU mAmGmCAAGUUAA AAUAAGGCUAGUC CGUUAUCAmAmCm UmUmGmAmAmAmA mAmGmUmGmGmCm AmCmCmGmAmGmU mCmGmGmUmGmCm U*mU*mU*mU	AGAUUGAGCU CUACUCAGGU GUUUUAGAGC UAGAAAUAGC AAGUUAAAAU AAGGCUAGUC CGUUAUCAAC UUGAAAAAGU GGCACCGAGU CGGUGCUUUU	chr16:108 95410- 10895430

G018031	11	CAGGUGGG CCCUCCUCC CUC	mC*mA*mG*GUGGG CCCUCCUCCCUCGU UUUAGAmGmCmUm AmGmAmAmAmUmA mGmCAAGUUAAAA UAAGGCUAGUCCG UUAUCAmAmCmUm UmGmAmAmAmAmA mGmUmGmGmCmAm CmCmGmAmGmUmC mGmGmUmGmCmU* mU*mU*mU	CAGGUGGGCC CUCCUCCCUC GUUUUAGAGC UAGAAAUAGC AAGUUAAAAU AAGGCUAGUC CGUUAUCAAC UUGAAAAAGU GGCACCGAGU CGGUGCUUUU	chr16:108 95425-10895445
G018032	12	CGGAAGAG ACCAGAGG GAGG	mC*mG*mG*AAGAG ACCAGAGGGAGGG UUUUAGAmGmCmU mAmGmAmAmAmU mAmGmCAAGUUAA AAUAAGGCUAGUC CGUUAUCAmAmCm UmUmGmAmAmAmA mAmGmUmGmGmCm AmCmCmGmAmGmU mCmGmGmUmGmCm U*mU*mU*mU	CGGAAGAGAC CAGAGGGAGG GUUUUAGAGC UAGAAAUAGC AAGUUAAAAU AAGGCUAGUC CGUUAUCAAC UUGAAAAAGU GGCACCGAGU CGGUGCUUUU	chr16:108 95437-10895457
G018033	13	UACCGGAA GAGACCAG AGGG	mU*mA*mC*CGGAA GAGACCAGAGGGG UUUUAGAmGmCmU mAmGmAmAmAmU mAmGmCAAGUUAA AAUAAGGCUAGUC CGUUAUCAmAmCm UmUmGmAmAmAmA mAmGmUmGmGmCm AmCmCmGmAmGmU mCmGmGmUmGmCm	UACCGGAAGA GACCAGAGGG GUUUUAGAGC UAGAAAUAGC AAGUUAAAAU AAGGCUAGUC CGUUAUCAAC UUGAAAAAGU GGCACCGAGU CGGUGCUUUU	chr16:108 95440-10895460

			U*mU*mU*mU		
G018034	14	AGGGAGGC UUAUGCCA AUAU	mA*mG*mG*GAGGC UUAUGCCAAUAUG UUUUAGAmGmCmU mAmGmAmAmAmU mAmGmCAAGUUAA AAUAAGGCUAGUC CGUUAUCAmAmCm UmUmGmAmAmAmA mAmGmUmGmGmCm AmCmCmGmAmGmU mCmGmGmUmGmCm U*mU*mU*mU	AGGGAGGCUU AUGCCAAUAU GUUUUAGAGC UAGAAAUAGC AAGUUAAAAU AAGGCUAGUC CGUUAUCAAC UUGAAAAAGU GGCACCGAGU CGGUGCUUUU	chr16:108 95742-10895762
G018035	15	GGCUUAUG CCAAUAUC GGUG	mG*mG*mC*UUAUG CCAAUAUCGGUGG UUUUAGAmGmCmU mAmGmAmAmAmU mAmGmCAAGUUAA AAUAAGGCUAGUC CGUUAUCAmAmCm UmUmGmAmAmAmA mAmGmUmGmGmCm AmCmCmGmAmGmU mCmGmGmUmGmCm U*mU*mU*mU	GGCUUAUGCC AAUAUCGGUG GUUUUAGAGC UAGAAAUAGC AAGUUAAAAU AAGGCUAGUC CGUUAUCAAC UUGAAAAAGU GGCACCGAGU CGGUGCUUUU	chr16:108 95747-10895767
G018036	16	UGACUGCG CUUUUCCU UGUC	mU*mG*mA*CUGCG CUUUUCCUUGUCG UUUUAGAmGmCmU mAmGmAmAmAmU mAmGmCAAGUUAA AAUAAGGCUAGUC CGUUAUCAmAmCm UmUmGmAmAmAmA mAmGmUmGmGmCm AmCmCmGmAmGmU	UGACUGCGCU UUUCCUUGUC GUUUUAGAGC UAGAAAUAGC AAGUUAAAAU AAGGCUAGUC CGUUAUCAAC UUGAAAAAGU GGCACCGAGU CGGUGCUUUU	chr16:108 98642-10898662

			mCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU		
G018037	17	GACUGCGCUUUUCCUUGUCU	mG*mA*mC*UGCGCUUUUCCUUGUCUGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmUmUmU*mU*mU*mU	GACUGCGCUUUUCCUUGUCUGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU	chr16:10898643-10898663
G018038	18	GCUUUUCCUUGUCUGGGCAG	mG*mC*mU*UUUCCUUGUCUGGGCAGGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmUmUmU*mU*mU*mU	GCUUUUCCUUGUCUGGGCAGGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU	chr16:10898649-10898669
G018039	19	CCAGUUCCGCUGCCCAGACA	mC*mC*mA*GUUCCGCUGCCCAGACAGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmUmUmU*mU*mU*mU	CCAGUUCCGCUGCCCAGACAGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU	chr16:10898658-10898678

			AmCmCmGmAmGmU mCmGmGmUmGmCm U*mU*mU*mU	CGGUGCUUUU	
G018040	20	GACCUGAA GCACUGGA AGCC	mG*mA*mC*CUGAA GCACUGGAAGCCG UUUUAGAmGmCmU mAmGmAmAmAmU mAmGmCAAGUUAA AAUAAGGCUAGUC CGUUAUCAmAmCm UmUmGmAmAmAmA mAmGmUmGmGmCm AmCmCmGmAmGmU mCmGmGmUmGmCm U*mU*mU*mU	GACCUGAAGC ACUGGAAGCC GUUUUAGAGC UAGAAAUAGC AAGUUAAAAU AAGGCUAGUC CGUUAUCAAC UUGAAAAAGU GGCACCGAGU CGGUGCUUUU	chr16:109 01536-10901556
G018041	21	GCACUGGA AGCCAGGU GUGC	mG*mC*mA*CUGGA AGCCAGGUGUGCG UUUUAGAmGmCmU mAmGmAmAmAmU mAmGmCAAGUUAA AAUAAGGCUAGUC CGUUAUCAmAmCm UmUmGmAmAmAmA mAmGmUmGmGmCm AmCmCmGmAmGmU mCmGmGmUmGmCm U*mU*mU*mU	GCACUGGAAG CCAGGUGUGC GUUUUAGAGC UAGAAAUAGC AAGUUAAAAU AAGGCUAGUC CGUUAUCAAC UUGAAAAAGU GGCACCGAGU CGGUGCUUUU	chr16:109 01544-10901564
G018042	22	CACUGGAA GCCAGGUG UGCA	mC*mA*mC*UGGAA GCCAGGUGUGCAG UUUUAGAmGmCmU mAmGmAmAmAmU mAmGmCAAGUUAA AAUAAGGCUAGUC CGUUAUCAmAmCm UmUmGmAmAmAmA	CACUGGAAGC CAGGUGUGCA GUUUUAGAGC UAGAAAUAGC AAGUUAAAAU AAGGCUAGUC CGUUAUCAAC UUGAAAAAGU	chr16:109 01545-10901565

			mAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	GGCACCGAGUCGGUGCUUUU	
G018043	23	GGAAGCCAGGUGUGCAGGGC	mG*mG*mA*AGCCAGGUGUGCAGGGCGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	GGAAGCCAGGUGUGCAGGGCGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU	chr16:10901549-10901569
G018044	24	AGCCAGGUGUGCAGGGCAGG	mA*mG*mC*CAGGUGUGCAGGGCAGGGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	AGCCAGGUGUGCAGGGCAGGGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU	chr16:10901552-10901572
G018045	25	GCCCACCUGCCCCUGCACACC	mG*mC*mC*CACCUGCCCCUGCACACCGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUm	GCCCACCUGCCCCUGCACACCGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAAC	chr16:10901557-10901577

			UmGmAmAmAmAmA mGmUmGmGmCmAm CmCmGmAmGmUmC mGmGmUmGmCmU* mU*mU*mU	UUGAAAAAGU GGCACCGAGU CGGUGCUUUU	
G018046	26	GGGCUCAG CUGUGAGG AAGU	mG*mG*mG*CUCAG CUGUGAGGAAGUG UUUUAGAmGmCmU mAmGmAmAmAmU mAmGmCAAGUUAA AAUAAGGCUAGUC CGUUAUCAmAmCm UmUmGmAmAmAmA mAmGmUmGmGmCm AmCmCmGmAmGmU mCmGmGmUmGmCm U*mU*mU*mU	GGGCUCAGCU GUGAGGAAGU GUUUUAGAGC UAGAAAUAGC AAGUUAAAAU AAGGCUAGUC CGUUAUCAAC UUGAAAAAGU GGCACCGAGU CGGUGCUUUU	chr16:109 02025- 10902045
G018047	27	GGGGCUCA GCUGUGAG GAAG	mG*mG*mG*GCUCA GCUGUGAGGAAGG UUUUAGAmGmCmU mAmGmAmAmAmU mAmGmCAAGUUAA AAUAAGGCUAGUC CGUUAUCAmAmCm UmUmGmAmAmAmA mAmGmUmGmGmCm AmCmCmGmAmGmU mCmGmGmUmGmCm U*mU*mU*mU	GGGGCUCAGC UGUGAGGAAG GUUUUAGAGC UAGAAAUAGC AAGUUAAAAU AAGGCUAGUC CGUUAUCAAC UUGAAAAAGU GGCACCGAGU CGGUGCUUUU	chr16:109 02026- 10902046
G018048	28	GACCAGAU UCCCAGUA UGUU	mG*mA*mC*CAGAU UCCCAGUAUGUUG UUUUAGAmGmCmU mAmGmAmAmAmU mAmGmCAAGUUAA AAUAAGGCUAGUC	GACCAGAUUC CCAGUAUGUU GUUUUAGAGC UAGAAAUAGC AAGUUAAAAU AAGGCUAGUC	chr16:109 02171- 10902191

			CGUUAUCAmAmCm UmUmGmAmAmAmA mAmGmUmGmGmCm AmCmCmGmAmGmU mCmGmGmUmGmCm U*mU*mU*mU	CGUUAUCAAC UUGAAAAAGU GGCACCGAGU CGGUGCUUUU	
G018049	29	CCAGAUUC CCAGUAUG UUAG	mC*mC*mA*GAUUC CCAGUAUGUUAGG UUUUAGAmGmCmU mAmGmAmAmAmU mAmGmCAAGUUAA AAUAAGGCUAGUC CGUUAUCAmAmCm UmUmGmAmAmAmA mAmGmUmGmGmCm AmCmCmGmAmGmU mCmGmGmUmGmCm U*mU*mU*mU	CCAGAUUCCC AGUAUGUUAG GUUUUAGAGC UAGAAAUAGC AAGUUAAAAU AAGGCUAGUC CGUUAUCAAC UUGAAAAAGU GGCACCGAGU CGGUGCUUUU	chr16:109 02173-10902193
G018050	30	CAGAUUCC CAGUAUGU UAGG	mC*mA*mG*AUUCC CAGUAUGUUAGGG UUUUAGAmGmCmU mAmGmAmAmAmU mAmGmCAAGUUAA AAUAAGGCUAGUC CGUUAUCAmAmCm UmUmGmAmAmAmA mAmGmUmGmGmCm AmCmCmGmAmGmU mCmGmGmUmGmCm U*mU*mU*mU	CAGAUUCCCA GUAUGUUAGG GUUUUAGAGC UAGAAAUAGC AAGUUAAAAU AAGGCUAGUC CGUUAUCAAC UUGAAAAAGU GGCACCGAGU CGGUGCUUUU	chr16:109 02174-10902194
G018051	31	UCCCAGUA UGUUAGGG GGCU	mU*mC*mC*CAGUA UGUUAGGGGGCUG UUUUAGAmGmCmU mAmGmAmAmAmU mAmGmCAAGUUAA	UCCCAGUAUG UUAGGGGGCU GUUUUAGAGC UAGAAAUAGC AAGUUAAAAU	chr16:109 02179-10902199

			AAUAAGGCUAGUC CGUUAUCAmAmCm UmUmGmAmAmAmA mAmGmUmGmGmCm AmCmCmGmAmGmU mCmGmGmUmGmCm U*mU*mU*mU	AAGGCUAGUC CGUUAUCAAC UUGAAAAAGU GGCACCGAGU CGGUGCUUUU	
G018052	32	UCCAAGCC CCCUAACA UACU	mU*mC*mC*AAGCC CCCUAACAUACUG UUUUAGAmGmCmU mAmGmAmAmAmU mAmGmCAAGUUAA AAUAAGGCUAGUC CGUUAUCAmAmCm UmUmGmAmAmAmA mAmGmUmGmGmCm AmCmCmGmAmGmU mCmGmGmUmGmCm U*mU*mU*mU	UCCAAGCCCC CUAACAUACU GUUUUAGAGC UAGAAAUAGC AAGUUAAAAU AAGGCUAGUC CGUUAUCAAC UUGAAAAAGU GGCACCGAGU CGGUGCUUUU	chr16:109 02183- 10902203
G018053	33	CUCCAAGC CCCCUAAC AUAC	mC*mU*mC*CAAGC CCCCUAACAUACG UUUUAGAmGmCmU mAmGmAmAmAmU mAmGmCAAGUUAA AAUAAGGCUAGUC CGUUAUCAmAmCm UmUmGmAmAmAmA mAmGmUmGmGmCm AmCmCmGmAmGmU mCmGmGmUmGmCm U*mU*mU*mU	CUCCAAGCCC CCUAACAUAC GUUUUAGAGC UAGAAAUAGC AAGUUAAAAU AAGGCUAGUC CGUUAUCAAC UUGAAAAAGU GGCACCGAGU CGGUGCUUUU	chr16:109 02184- 10902204
G018054	34	AAAGGCAC UGCAAGAG ACAA	mA*mA*mA*GGCAC UGCAAGAGACAAG UUUUAGAmGmCmU mAmGmAmAmAmU	AAAGGCACUG CAAGAGACAA GUUUUAGAGC UAGAAAUAGC	chr16:109 02644- 10902664

			mAmGmCAAGUUAA AAUAAGGCUAGUC CGUUAUCAmAmCm UmUmGmAmAmAmA mAmGmUmGmGmCm AmCmCmGmAmGmU mCmGmGmUmGmCm U*mU*mU*mU	AAGUUAAAAU AAGGCUAGUC CGUUAUCAAC UUGAAAAAGU GGCACCGAGU CGGUGCUUUU	
G018055	35	UCCAGUAU AUUCAUCU ACCA	mU*mC*mC*AGUAU AUUCAUCUACCAG UUUUAGAmGmCmU mAmGmAmAmAmU mAmGmCAAGUUAA AAUAAGGCUAGUC CGUUAUCAmAmCm UmUmGmAmAmAmA mAmGmUmGmGmCm AmCmCmGmAmGmU mCmGmGmUmGmCm U*mU*mU*mU	UCCAGUAUAU UCAUCUACCA GUUUUAGAGC UAGAAAUAGC AAGUUAAAAU AAGGCUAGUC CGUUAUCAAC UUGAAAAAGU GGCACCGAGU CGGUGCUUUU	chr16:109 02779- 10902799
G018056	36	UUCAUCUA CCAUGGUG AGUG	mU*mU*mC*AUCUA CCAUGGUGAGUGG UUUUAGAmGmCmU mAmGmAmAmAmU mAmGmCAAGUUAA AAUAAGGCUAGUC CGUUAUCAmAmCm UmUmGmAmAmAmA mAmGmUmGmGmCm AmCmCmGmAmGmU mCmGmGmUmGmCm U*mU*mU*mU	UUCAUCUACC AUGGUGAGUG GUUUUAGAGC UAGAAAUAGC AAGUUAAAAU AAGGCUAGUC CGUUAUCAAC UUGAAAAAGU GGCACCGAGU CGGUGCUUUU	chr16:109 02788- 10902808
G018057	37	UCAUCUAC CAUGGUGA GUGC	mU*mC*mA*UCUAC CAUGGUGAGUGCG UUUUAGAmGmCmU	UCAUCUACCA UGGUGAGUGC GUUUUAGAGC	chr16:109 02789- 10902809

			mAmGmAmAmAmU mAmGmCAAGUUAA AAUAAGGCUAGUC CGUUAUCAmAmCm UmUmGmAmAmAmA mAmGmUmGmGmCm AmCmCmGmAmGmU mCmGmGmUmGmCm U*mU*mU*mU	UAGAAAUAGC AAGUUAAAAU AAGGCUAGUC CGUUAUCAAC UUGAAAAAGU GGCACCGAGU CGGUGCUUUU	
G018058	38	CAUCUACC AUGGUGAG UGCG	mC*mA*mU*CUACC AUGGUGAGUGCGG UUUUAGAmGmCmU mAmGmAmAmAmU mAmGmCAAGUUAA AAUAAGGCUAGUC CGUUAUCAmAmCm UmUmGmAmAmAmA mAmGmUmGmGmCm AmCmCmGmAmGmU mCmGmGmUmGmCm U*mU*mU*mU	CAUCUACCAU GGUGAGUGCG GUUUUAGAGC UAGAAAUAGC AAGUUAAAAU AAGGCUAGUC CGUUAUCAAC UUGAAAAAGU GGCACCGAGU CGGUGCUUUU	chr16:109 02790- 10902810
G018059	39	ACCAUGGU GAGUGCGG GGCC	mA*mC*mC*AUGGU GAGUGCGGGGCCG UUUUAGAmGmCmU mAmGmAmAmAmU mAmGmCAAGUUAA AAUAAGGCUAGUC CGUUAUCAmAmCm UmUmGmAmAmAmA mAmGmUmGmGmCm AmCmCmGmAmGmU mCmGmGmUmGmCm U*mU*mU*mU	ACCAUGGUGA GUGCGGGGCC GUUUUAGAGC UAGAAAUAGC AAGUUAAAAU AAGGCUAGUC CGUUAUCAAC UUGAAAAAGU GGCACCGAGU CGGUGCUUUU	chr16:109 02795- 10902815
G018060	40	GCCAGGCC CCGCACUC	mG*mC*mC*AGGCC CCGCACUCACCAGU	GCCAGGCCCC GCACUCACCA	chr16:109 02799-

		ACCA	UUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU	10902819
G018061	41	CCACUCUCCACCCCCAAUGU	mC*mC*mA*CUCUCCACCCCCAAUGUGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	CCACUCUCCACCCCCAAUGUGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU	chr16:10903708-10903728
G018062	42	CUCCACCCCCAAUGUAGGUG	mC*mU*mC*CACCCCCAAUGUAGGUGGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	CUCCACCCCCAAUGUAGGUGGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU	chr16:10903713-10903733
G018063	43	CACCUCACC	mC*mA*mC*CUCAC	CACCUCACCU	chr16:109

		UACAUUGGGGG	CUACAUUGGGGGGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	ACAUUGGGGGGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU	03718-10903738
G018064	44	GGGCACCUCACCUACAUUGG	mG*mG*mG*CACCUCACCUACAUUGGGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	GGGCACCUCACCUACAUUGGGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU	chr16:10903721-10903741
G018065	45	UGGGGCACCUCACCUACAUU	mU*mG*mG*GGCACCUCACCUACAUUGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	UGGGGCACCUCACCUACAUUGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU	chr16:10903723-10903743

G018066	46	CUGGGGCACCUCACCUACAU	mC*mU*mG*GGGCACCUCACCUACAUGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	CUGGGGCACCUCACCUACAUGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU	chr16:10903724-10903744
G018067	47	ACCUCCCGAGCAAACAUGAC	mA*mC*mC*UCCCGAGCAAACAUGACGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	ACCUCCCGAGCAAACAUGACGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU	chr16:10903873-10903893
G018068	48	CCGAGCAAACAUGACAGGUA	mC*mC*mG*AGCAAACAUGACAGGUAGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmGmUmGmCmU	CCGAGCAAACAUGACAGGUAGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU	chr16:10903878-10903898

			U*mU*mU*mU		
G018069	49	GUACCUCU CACAGGCC CUAA	mG*mU*mA*CCUCU CACAGGCCCUAAG UUUUAGAmGmCmU mAmGmAmAmAmU mAmGmCAAGUUAA AAUAAGGCUAGUC CGUUAUCAmAmCm UmUmGmAmAmAmA mAmGmUmGmGmCm AmCmCmGmAmGmU mCmGmGmUmGmCm U*mU*mU*mU	GUACCUCUCA CAGGCCCUAA GUUUUAGAGC UAGAAAUAGC AAGUUAAAAU AAGGCUAGUC CGUUAUCAAC UUGAAAAAGU GGCACCGAGU CGGUGCUUUU	chr16:109 03905-10903925
G018070	50	AGUACCUC UCACAGGC CCUA	mA*mG*mU*ACCUC UCACAGGCCCUAG UUUUAGAmGmCmU mAmGmAmAmAmU mAmGmCAAGUUAA AAUAAGGCUAGUC CGUUAUCAmAmCm UmUmGmAmAmAmA mAmGmUmGmGmCm AmCmCmGmAmGmU mCmGmGmUmGmCm U*mU*mU*mU	AGUACCUCUC ACAGGCCCUA GUUUUAGAGC UAGAAAUAGC AAGUUAAAAU AAGGCUAGUC CGUUAUCAAC UUGAAAAAGU GGCACCGAGU CGGUGCUUUU	chr16:109 03906-10903926
G018071	51	GACGUCUU GUGCUCUG GAGA	mG*mA*mC*GUCUU GUGCUCUGGAGAG UUUUAGAmGmCmU mAmGmAmAmAmU mAmGmCAAGUUAA AAUAAGGCUAGUC CGUUAUCAmAmCm UmUmGmAmAmAmA mAmGmUmGmGmCm AmCmCmGmAmGmU	GACGUCUUGU GCUCUGGAGA GUUUUAGAGC UAGAAAUAGC AAGUUAAAAU AAGGCUAGUC CGUUAUCAAC UUGAAAAAGU GGCACCGAGU CGGUGCUUUU	chr16:109 04736-10904756

			mCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU		
G018072	52	AACAAGCUUCCAAAAUGGCC	mA*mA*mC*AAGCUUCCAAAAUGGCCGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	AACAAGCUUCCAAAAUGGCCGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU	chr16:10904790-10904810
G018073	53	GAGAUCCCGCAUCACUCACC	mG*mA*mG*AUCCCGCAUCACUCACCGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	GAGAUCCCGCAUCACUCACCGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU	chr16:10904811-10904831
G018074	54	GCCCCUGGCCUUUGCAGAGC	mG*mC*mC*CCUGGCCUUUGCAGAGCGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCm	GCCCCUGGCCUUUGCAGAGCGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGU	chr16:10906481-10906501

			AmCmCmGmAmGmU mCmGmGmUmGmCm U*mU*mU*mU	CGGUGCUUUU	
G018075	55	ACCGGCUC UGCAAAGG CCAG	mA*mC*mC*GGCUC UGCAAAGGCCAGG UUUUAGAmGmCmU mAmGmAmAmAmU mAmGmCAAGUUAA AAUAAGGCUAGUC CGUUAUCAmAmCm UmUmGmAmAmAmA mAmGmUmGmGmCm AmCmCmGmAmGmU mCmGmGmUmGmCm U*mU*mU*mU	ACCGGCUCUG CAAAGGCCAG GUUUUAGAGC UAGAAAUAGC AAGUUAAAAU AAGGCUAGUC CGUUAUCAAC UUGAAAAAGU GGCACCGAGU CGGUGCUUUU	chr16:109 06485-10906505
G018076	56	CACCGGCU CUGCAAAG GCCA	mC*mA*mC*CGGCU CUGCAAAGGCCAG UUUUAGAmGmCmU mAmGmAmAmAmU mAmGmCAAGUUAA AAUAAGGCUAGUC CGUUAUCAmAmCm UmUmGmAmAmAmA mAmGmUmGmGmCm AmCmCmGmAmGmU mCmGmGmUmGmCm U*mU*mU*mU	CACCGGCUCU GCAAAGGCCA GUUUUAGAGC UAGAAAUAGC AAGUUAAAAU AAGGCUAGUC CGUUAUCAAC UUGAAAAAGU GGCACCGAGU CGGUGCUUUU	chr16:109 06486-10906506
G018077	57	CCACCGGC UCUGCAAA GGCC	mC*mC*mA*CCGGC UCUGCAAAGGCCG UUUUAGAmGmCmU mAmGmAmAmAmU mAmGmCAAGUUAA AAUAAGGCUAGUC CGUUAUCAmAmCm UmUmGmAmAmAmA	CCACCGGCUC UGCAAAGGCC GUUUUAGAGC UAGAAAUAGC AAGUUAAAAU AAGGCUAGUC CGUUAUCAAC UUGAAAAAGU	chr16:109 06487-10906507

			mAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	GGCACCGAGUCGGUGCUUUU	
G018078	58	CUGCUCCACCGGCUCUGCAA	mC*mU*mG*CUCCACCGGCUCUGCAAGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	CUGCUCCACCGGCUCUGCAAGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU	chr16:10906492-10906512
G018079	59	UCAGCUGUGUCACCCGUUUC	mU*mC*mA*GCUGUGUCACCCGUUUCGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	UCAGCUGUGUCACCCGUUUCGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU	chr16:10908127-10908147
G018080	60	GCUGUGUCACCCGUUUCAGG	mG*mC*mU*GUGUCACCCGUUUCAGGGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCm	GCUGUGUCACCCGUUUCAGGGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAAC	chr16:10908130-10908150

			UmUmGmAmAmAmA mAmGmUmGmGmCm AmCmCmGmAmGmU mCmGmGmUmGmCm U*mU*mU*mU	UUGAAAAAGU GGCACCGAGU CGGUGCUUUU	
G018081	61	CUGUGUCA CCCGUUUC AGGU	mC*mU*mG*UGUCA CCCGUUUCAGGUG UUUUAGAmGmCmU mAmGmAmAmAmU mAmGmCAAGUUAA AAUAAGGCUAGUC CGUUAUCAmAmCm UmUmGmAmAmAmA mAmGmUmGmGmCm AmCmCmGmAmGmU mCmGmGmUmGmCm U*mU*mU*mU	CUGUGUCACC CGUUUCAGGU GUUUUAGAGC UAGAAAUAGC AAGUUAAAAU AAGGCUAGUC CGUUAUCAAC UUGAAAAAGU GGCACCGAGU CGGUGCUUUU	chr16:109 08131- 10908151
G018082	62	UGUGUCAC CCGUUUCA GGUG	mU*mG*mU*GUCAC CCGUUUCAGGUGG UUUUAGAmGmCmU mAmGmAmAmAmU mAmGmCAAGUUAA AAUAAGGCUAGUC CGUUAUCAmAmCm UmUmGmAmAmAmA mAmGmUmGmGmCm AmCmCmGmAmGmU mCmGmGmUmGmCm U*mU*mU*mU	UGUGUCACCC GUUUCAGGUG GUUUUAGAGC UAGAAAUAGC AAGUUAAAAU AAGGCUAGUC CGUUAUCAAC UUGAAAAAGU GGCACCGAGU CGGUGCUUUU	chr16:109 08132- 10908152
G018083	63	CACCCGUU UCAGGUGG GGUG	mC*mA*mC*CCGUU UCAGGUGGGGUGG UUUUAGAmGmCmU mAmGmAmAmAmU mAmGmCAAGUUAA AAUAAGGCUAGUC	CACCCGUUUC AGGUGGGGUG GUUUUAGAGC UAGAAAUAGC AAGUUAAAAU AAGGCUAGUC	chr16:109 08137- 10908157

			CGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	CGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU	
G018084	64	ACCCGUUUCAGGUGGGGUGA	mA*mC*mC*CGUUUCAGGUGGGGUGAGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	ACCCGUUUCAGGUGGGGUGAGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU	chr16:10908138-10908158
G018085	65	CCCGUUUCAGGUGGGGUGAG	mC*mC*mC*GUUUCAGGUGGGGUGAGGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	CCCGUUUCAGGUGGGGUGAGGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU	chr16:10908139-10908159
G018086	66	GUCUGAGGCCCUCCCUCCAC	mG*mU*mC*UGAGGCCCUCCCUCCACGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAA	GUCUGAGGCCCUCCCUCCACGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAU	chr16:10909006-10909026

			UAAGGCUAGUCCG UUAUCAmAmCmUm UmGmAmAmAmAmA mGmUmGmGmCmAm CmCmGmAmGmUmC mGmGmUmGmCmU* mU*mU*mU	AAGGCUAGUC CGUUAUCAAC UUGAAAAAGU GGCACCGAGU CGGUGCUUUU	
G018087	67	UCUGAGGC CCUCCCUCC ACA	mU*mC*mU*GAGGC CCUCCCUCCACAGU UUUAGAmGmCmUm AmGmAmAmAmUmA mGmCAAGUUAAAA UAAGGCUAGUCCG UUAUCAmAmCmUm UmGmAmAmAmAmA mGmUmGmGmCmAm CmCmGmAmGmUmC mGmGmUmGmCmU* mU*mU*mU	UCUGAGGCCC UCCCUCCACA GUUUUAGAGC UAGAAAUAGC AAGUUAAAAU AAGGCUAGUC CGUUAUCAAC UUGAAAAAGU GGCACCGAGU CGGUGCUUUU	chr16:109 09007- 10909027
G018088	68	CAAGGCAG CCCUGUGG AGGG	mC*mA*mA*GGCAG CCCUGUGGAGGGG UUUUAGAmGmCmU mAmGmAmAmAmU mAmGmCAAGUUAA AAUAAGGCUAGUC CGUUAUCAmAmCm UmUmGmAmAmAmA mAmGmUmGmGmCm AmCmCmGmAmGmU mCmGmGmUmGmCm U*mU*mU*mU	CAAGGCAGCC CUGUGGAGGG GUUUUAGAGC UAGAAAUAGC AAGUUAAAAU AAGGCUAGUC CGUUAUCAAC UUGAAAAAGU GGCACCGAGU CGGUGCUUUU	chr16:109 09018- 10909038
G018089	69	GCUCAAGG CAGCCCUG UGGA	mG*mC*mU*CAAGG CAGCCCUGUGGAG UUUUAGAmGmCmU mAmGmAmAmAmU	GCUCAAGGCA GCCCUGUGGA GUUUUAGAGC UAGAAAUAGC	chr16:109 09021- 10909041

			mAmGmCAAGUUAA AAUAAGGCUAGUC CGUUAUCAmAmCm UmUmGmAmAmAmA mAmGmUmGmGmCm AmCmCmGmAmGmU mCmGmGmUmGmCm U*mU*mU*mU	AAGUUAAAAU AAGGCUAGUC CGUUAUCAAC UUGAAAAAGU GGCACCGAGU CGGUGCUUUU	
G018090	70	CGCUCAAG GCAGCCCU GUGG	mC*mG*mC*UCAAG GCAGCCCUGUGGG UUUUAGAmGmCmU mAmGmAmAmAmU mAmGmCAAGUUAA AAUAAGGCUAGUC CGUUAUCAmAmCm UmUmGmAmAmAmA mAmGmUmGmGmCm AmCmCmGmAmGmU mCmGmGmUmGmCm U*mU*mU*mU	CGCUCAAGGC AGCCCUGUGG GUUUUAGAGC UAGAAAUAGC AAGUUAAAAU AAGGCUAGUC CGUUAUCAAC UUGAAAAAGU GGCACCGAGU CGGUGCUUUU	chr16:109 09022-10909042
G018091	71	UGUGCAGA CUCAGAGG UGAG	mU*mG*mU*GCAGA CUCAGAGGUGAGG UUUUAGAmGmCmU mAmGmAmAmAmU mAmGmCAAGUUAA AAUAAGGCUAGUC CGUUAUCAmAmCm UmUmGmAmAmAmA mAmGmUmGmGmCm AmCmCmGmAmGmU mCmGmGmUmGmCm U*mU*mU*mU	UGUGCAGACU CAGAGGUGAG GUUUUAGAGC UAGAAAUAGC AAGUUAAAAU AAGGCUAGUC CGUUAUCAAC UUGAAAAAGU GGCACCGAGU CGGUGCUUUU	chr16:109 09172-10909192
G018092	72	UAACAUUG CCUGUUCU CUCC	mU*mA*mA*CAUUG CCUGUUCUCUCCG UUUUAGAmGmCmU	UAACAUUGCC UGUUCUCUCC GUUUUAGAGC	chr16:109 10165-10910185

			mAmGmAmAmAmU mAmGmCAAGUUAA AAUAAGGCUAGUC CGUUAUCAmAmCm UmUmGmAmAmAmA mAmGmUmGmGmCm AmCmCmGmAmGmU mCmGmGmUmGmCm U*mU*mU*mU	UAGAAAUAGC AAGUUAAAAU AAGGCUAGUC CGUUAUCAAC UUGAAAAAGU GGCACCGAGU CGGUGCUUUU	
G018093	73	CUUCUCGU CCUGGAGA GAAC	mC*mU*mU*CUCGU CCUGGAGAGAACG UUUUAGAmGmCmU mAmGmAmAmAmU mAmGmCAAGUUAA AAUAAGGCUAGUC CGUUAUCAmAmCm UmUmGmAmAmAmA mAmGmUmGmGmCm AmCmCmGmAmGmU mCmGmGmUmGmCm U*mU*mU*mU	CUUCUCGUCC UGGAGAGAAC GUUUUAGAGC UAGAAAUAGC AAGUUAAAAU AAGGCUAGUC CGUUAUCAAC UUGAAAAAGU GGCACCGAGU CGGUGCUUUU	chr16:109 10176- 10910196
G018094	74	UUCCGAGG AACUUCUC GUCC	mU*mU*mC*CGAGG AACUUCUCGUCCG UUUUAGAmGmCmU mAmGmAmAmAmU mAmGmCAAGUUAA AAUAAGGCUAGUC CGUUAUCAmAmCm UmUmGmAmAmAmA mAmGmUmGmGmCm AmCmCmGmAmGmU mCmGmGmUmGmCm U*mU*mU*mU	UUCCGAGGAA CUUCUCGUCC GUUUUAGAGC UAGAAAUAGC AAGUUAAAAU AAGGCUAGUC CGUUAUCAAC UUGAAAAAGU GGCACCGAGU CGGUGCUUUU	chr16:109 10186- 10910206
G018095	75	ACCCUUGC UCUUUGCC	mA*mC*mC*CUUGC UCUUUGCCUCCUG	ACCCUUGCUC UUUGCCUCCU	chr16:109 15547-

		UCCU	UUUUAGAmGmCmU mAmGmAmAmAmU mAmGmCAAGUUAA AAUAAGGCUAGUC CGUUAUCAmAmCm UmUmGmAmAmAmA mAmGmUmGmGmCm AmCmCmGmAmGmU mCmGmGmUmGmCm U*mU*mU*mU	GUUUUAGAGC UAGAAAUAGC AAGUUAAAAU AAGGCUAGUC CGUUAUCAAC UUGAAAAAGU GGCACCGAGU CGGUGCUUUU	10915567
G018096	76	UUGCUCUU UGCCUCCU AGGC	mU*mU*mG*CUCUU UGCCUCCUAGGCG UUUUAGAmGmCmU mAmGmAmAmAmU mAmGmCAAGUUAA AAUAAGGCUAGUC CGUUAUCAmAmCm UmUmGmAmAmAmA mAmGmUmGmGmCm AmCmCmGmAmGmU mCmGmGmUmGmCm U*mU*mU*mU	UUGCUCUUUG CCUCCUAGGC GUUUUAGAGC UAGAAAUAGC AAGUUAAAAU AAGGCUAGUC CGUUAUCAAC UUGAAAAAGU GGCACCGAGU CGGUGCUUUU	chr16:109 15551-10915571
G018097	77	UGCUCUUU GCCUCCUA GGCU	mU*mG*mC*UCUUU GCCUCCUAGGCUG UUUUAGAmGmCmU mAmGmAmAmAmU mAmGmCAAGUUAA AAUAAGGCUAGUC CGUUAUCAmAmCm UmUmGmAmAmAmA mAmGmUmGmGmCm AmCmCmGmAmGmU mCmGmGmUmGmCm U*mU*mU*mU	UGCUCUUUGC CUCCUAGGCU GUUUUAGAGC UAGAAAUAGC AAGUUAAAAU AAGGCUAGUC CGUUAUCAAC UUGAAAAAGU GGCACCGAGU CGGUGCUUUU	chr16:109 15552-10915572
G018098	78	CCUGAGAC	mC*mC*mU*GAGAC	CCUGAGACAG	chr16:109

		AGGGCCCA GCCU	AGGGCCCAGCCUG UUUUAGAmGmCmU mAmGmAmAmAmU mAmGmCAAGUUAA AAUAAGGCUAGUC CGUUAUCAmAmCm UmUmGmAmAmAmA mAmGmUmGmGmCm AmCmCmGmAmGmU mCmGmGmUmGmCm U*mU*mU*mU	GGCCCAGCCU GUUUUAGAGC UAGAAAUAGC AAGUUAAAAU AAGGCUAGUC CGUUAUCAAC UUGAAAAAGU GGCACCGAGU CGGUGCUUUU	15567-10915587
G018099	79	AUCUGAUU CCACCUGC AGCC	mA*mU*mC*UGAUU CCACCUGCAGCCGU UUUAGAmGmCmUm AmGmAmAmAmUmA mGmCAAGUUAAAA UAAGGCUAGUCCG UUAUCAmAmCmUm UmGmAmAmAmAmA mGmUmGmGmCmAm CmCmGmAmGmUmC mGmGmUmGmCmU* mU*mU*mU	AUCUGAUUCC ACCUGCAGCC GUUUUAGAGC UAGAAAUAGC AAGUUAAAAU AAGGCUAGUC CGUUAUCAAC UUGAAAAAGU GGCACCGAGU CGGUGCUUUU	chr16:10916348-10916368
G018100	80	CAGCGCAU CCAGGCUG CAGG	mC*mA*mG*CGCAU CCAGGCUGCAGGG UUUUAGAmGmCmU mAmGmAmAmAmU mAmGmCAAGUUAA AAUAAGGCUAGUC CGUUAUCAmAmCm UmUmGmAmAmAmA mAmGmUmGmGmCm AmCmCmGmAmGmU mCmGmGmUmGmCm U*mU*mU*mU	CAGCGCAUCC AGGCUGCAGG GUUUUAGAGC UAGAAAUAGC AAGUUAAAAU AAGGCUAGUC CGUUAUCAAC UUGAAAAAGU GGCACCGAGU CGGUGCUUUU	chr16:10916359-10916379

G018101	81	ACUCAGCG CAUCCAGG CUGC	mA*mC*mU*CAGCG CAUCCAGGCUGCG UUUUAGAmGmCmU mAmGmAmAmAmU mAmGmCAAGUUAA AAUAAGGCUAGUC CGUUAUCAmAmCm UmUmGmAmAmAmA mAmGmUmGmGmCm AmCmCmGmAmGmU mCmGmGmUmGmCm U*mU*mU*mU	ACUCAGCGCA UCCAGGCUGC GUUUUAGAGC UAGAAAUAGC AAGUUAAAAU AAGGCUAGUC CGUUAUCAAC UUGAAAAAGU GGCACCGAGU CGGUGCUUUU	chr16:109 16362-10916382
G018102	82	AAACCCUC AAGUGAGU GAGC	mA*mA*mA*CCCUC AAGUGAGUGAGCG UUUUAGAmGmCmU mAmGmAmAmAmU mAmGmCAAGUUAA AAUAAGGCUAGUC CGUUAUCAmAmCm UmUmGmAmAmAmA mAmGmUmGmGmCm AmCmCmGmAmGmU mCmGmGmUmGmCm U*mU*mU*mU	AAACCCUCAA GUGAGUGAGC GUUUUAGAGC UAGAAAUAGC AAGUUAAAAU AAGGCUAGUC CGUUAUCAAC UUGAAAAAGU GGCACCGAGU CGGUGCUUUU	chr16:109 16449-10916469
G018103	83	AACCCUCA AGUGAGUG AGCU	mA*mA*mC*CCUCA AGUGAGUGAGCUG UUUUAGAmGmCmU mAmGmAmAmAmU mAmGmCAAGUUAA AAUAAGGCUAGUC CGUUAUCAmAmCm UmUmGmAmAmAmA mAmGmUmGmGmCm AmCmCmGmAmGmU mCmGmGmUmGmCm	AACCCUCAAG UGAGUGAGCU GUUUUAGAGC UAGAAAUAGC AAGUUAAAAU AAGGCUAGUC CGUUAUCAAC UUGAAAAAGU GGCACCGAGU CGGUGCUUUU	chr16:109 16450-10916470

			U*mU*mU*mU		
G018104	84	GGCCCAGC UCACUCAC UUGA	mG*mG*mC*CCAGC UCACUCACUUGAG UUUUAGAmGmCmU mAmGmAmAmAmU mAmGmCAAGUUAA AAUAAGGCUAGUC CGUUAUCAmAmCm UmUmGmAmAmAmA mAmGmUmGmGmCm AmCmCmGmAmGmU mCmGmGmUmGmCm U*mU*mU*mU	GGCCCAGCUC ACUCACUUGA GUUUUAGAGC UAGAAAUAGC AAGUUAAAAU AAGGCUAGUC CGUUAUCAAC UUGAAAAAGU GGCACCGAGU CGGUGCUUUU	chr16:109 16455- 10916475
G018105	85	AGGCCCAG CUCACUCA CUUG	mA*mG*mG*CCCAG CUCACUCACUUGG UUUUAGAmGmCmU mAmGmAmAmAmU mAmGmCAAGUUAA AAUAAGGCUAGUC CGUUAUCAmAmCm UmUmGmAmAmAmA mAmGmUmGmGmCm AmCmCmGmAmGmU mCmGmGmUmGmCm U*mU*mU*mU	AGGCCCAGCU CACUCACUUG GUUUUAGAGC UAGAAAUAGC AAGUUAAAAU AAGGCUAGUC CGUUAUCAAC UUGAAAAAGU GGCACCGAGU CGGUGCUUUU	chr16:109 16456- 10916476
G018106	86	CAGACUGC GGGGACAC AGUG	mC*mA*mG*ACUGC GGGGACACAGUGG UUUUAGAmGmCmU mAmGmAmAmAmU mAmGmCAAGUUAA AAUAAGGCUAGUC CGUUAUCAmAmCm UmUmGmAmAmAmA mAmGmUmGmGmCm AmCmCmGmAmGmU	CAGACUGCGG GGACACAGUG GUUUUAGAGC UAGAAAUAGC AAGUUAAAAU AAGGCUAGUC CGUUAUCAAC UUGAAAAAGU GGCACCGAGU CGGUGCUUUU	chr16:109 18423- 10918443

			mCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU		
G018107	87	CUGCAUCCCUGCUCAGGCUA	mC*mU*mG*CAUCCCUGCUCAGGCUAGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	CUGCAUCCCUGCUCAGGCUAGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU	chr16:10918504-10918524
G018108	88	CCUGCUCAGGCUAAGGUGAG	mC*mC*mU*GCUCAGGCUAAGGUGAGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	CCUGCUCAGGCUAAGGUGAGGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU	chr16:10918511-10918531
G018109	89	CUGCUCAGGCUAAGGUGAGU	mC*mU*mG*CUCAGGCUAAGGUGAGUGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	CUGCUCAGGCUAAGGUGAGUGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU	chr16:10918512-10918532

			AmCmCmGmAmGmU mCmGmGmUmGmCm U*mU*mU*mU	CGGUGCUUUU	
G018110	90	CAGCACCU GACCGGUA UCCG	mC*mA*mG*CACCU GACCGGUAUCCGG UUUUAGAmGmCmU mAmGmAmAmAmU mAmGmCAAGUUAA AAUAAGGCUAGUC CGUUAUCAmAmCm UmUmGmAmAmAmA mAmGmUmGmGmCm AmCmCmGmAmGmU mCmGmGmUmGmCm U*mU*mU*mU	CAGCACCUGA CCGGUAUCCG GUUUUAGAGC UAGAAAUAGC AAGUUAAAAU AAGGCUAGUC CGUUAUCAAC UUGAAAAAGU GGCACCGAGU CGGUGCUUUU	chr16:109 18539-10918559
G018111	91	GUACAAGC UGUCGGAA ACAG	mG*mU*mA*CAAGC UGUCGGAAACAGG UUUUAGAmGmCmU mAmGmAmAmAmU mAmGmCAAGUUAA AAUAAGGCUAGUC CGUUAUCAmAmCm UmUmGmAmAmAmA mAmGmUmGmGmCm AmCmCmGmAmGmU mCmGmGmUmGmCm U*mU*mU*mU	GUACAAGCUG UCGGAAACAG GUUUUAGAGC UAGAAAUAGC AAGUUAAAAU AAGGCUAGUC CGUUAUCAAC UUGAAAAAGU GGCACCGAGU CGGUGCUUUU	chr16:109 22153-10922173
G018112	92	GGAGACGC UGGCGUAA GUCC	mG*mG*mA*GACGC UGGCGUAAGUCCG UUUUAGAmGmCmU mAmGmAmAmAmU mAmGmCAAGUUAA AAUAAGGCUAGUC CGUUAUCAmAmCm UmUmGmAmAmAmA	GGAGACGCUG GCGUAAGUCC GUUUUAGAGC UAGAAAUAGC AAGUUAAAAU AAGGCUAGUC CGUUAUCAAC UUGAAAAAGU	chr16:109 22478-10922498

			mAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	GGCACCGAGUCGGUGCUUUU	
G018113	93	GGCGUAAGUCCAGGCAACCC	mG*mG*mC*GUAAGUCCAGGCAACCCGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	GGCGUAAGUCCAGGCAACCCGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU	chr16:10922487-10922507
G018114	94	CUCCACCCACCAGGGUUGCC	mC*mU*mC*CACCCACCAGGGUUGCCGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	CUCCACCCACCAGGGUUGCCGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU	chr16:10922499-10922519
G018115	95	UGAGUCCCAUCCCCCCCUUGC	mU*mG*mA*GUCCCAUCCCCCCCUUGCGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUm	UGAGUCCCAUCCCCCCUUGCGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAAC	chr16:10923205-10923225

			UmGmAmAmAmAmA mGmUmGmGmCmAm CmCmGmAmGmUmC mGmGmUmGmCmU* mU*mU*mU	UUGAAAAAGU GGCACCGAGU CGGUGCUUUU	
G018116	96	CCACAUCC UGCAAGGG GGGA	mC*mC*mA*CAUCC UGCAAGGGGGGAG UUUUAGAmGmCmU mAmGmAmAmAmU mAmGmCAAGUUAA AAUAAGGCUAGUC CGUUAUCAmAmCm UmUmGmAmAmAmA mAmGmUmGmGmCm AmCmCmGmAmGmU mCmGmGmUmGmCm U*mU*mU*mU	CCACAUCCUG CAAGGGGGGA GUUUUAGAGC UAGAAAUAGC AAGUUAAAAU AAGGCUAGUC CGUUAUCAAC UUGAAAAAGU GGCACCGAGU CGGUGCUUUU	chr16:109 23214- 10923234
G018117	97	GCGUCCAC AUCCUGCA AGGG	mG*mC*mG*UCCAC AUCCUGCAAGGGG UUUUAGAmGmCmU mAmGmAmAmAmU mAmGmCAAGUUAA AAUAAGGCUAGUC CGUUAUCAmAmCm UmUmGmAmAmAmA mAmGmUmGmGmCm AmCmCmGmAmGmU mCmGmGmUmGmCm U*mU*mU*mU	GCGUCCACAU CCUGCAAGGG GUUUUAGAGC UAGAAAUAGC AAGUUAAAAU AAGGCUAGUC CGUUAUCAAC UUGAAAAAGU GGCACCGAGU CGGUGCUUUU	chr16:109 23218- 10923238
G018118	98	GGCGUCCA CAUCCUGC AAGG	mG*mG*mC*GUCCA CAUCCUGCAAGGG UUUUAGAmGmCmU mAmGmAmAmAmU mAmGmCAAGUUAA AAUAAGGCUAGUC	GGCGUCCACA UCCUGCAAGG GUUUUAGAGC UAGAAAUAGC AAGUUAAAAU AAGGCUAGUC	chr16:109 23219- 10923239

			CGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	CGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU	
G018119	99	GGGCGUCCACAUCCUGCAAG	mG*mG*mG*CGUCCACAUCCUGCAAGGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	GGGCGUCCACAUCCUGCAAGGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU	chr16:10923220-10923240
G018120	100	UGGGCGUCCACAUCCUGCAA	mU*mG*mG*GCGUCCACAUCCUGCAAGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	UGGGCGUCCACAUCCUGCAAGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU	chr16:10923221-10923241
G018121	101	GUGGGCGUCCACAUCCUGCA	mG*mU*mG*GGCGUCCACAUCCUGCAGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAA	GUGGGCGUCCACAUCCUGCAGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAU	chr16:10923222-10923242

			AAUAAGGCUAGUC CGUUAUCAmAmCm UmUmGmAmAmAmA mAmGmUmGmGmCm AmCmCmGmAmGmU mCmGmGmUmGmCm U*mU*mU*mU	AAGGCUAGUC CGUUAUCAAC UUGAAAAAGU GGCACCGAGU CGGUGCUUUU	

[00168] Термины «mA», «mC», «mU» или «mG» могут использоваться для обозначения нуклеотида, модифицированного 2'-O-Me.

[00169] В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит направляющую последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1-101. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит направляющую последовательность, которая представляет собой по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 1-101. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит направляющую последовательность, которая по меньшей мере на 95%, 90% или 85% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 1-101. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит направляющую последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 1-101.

[00170] В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит направляющую последовательность, которая содержит по меньшей мере 10 смежных нуклеотидов ± 10 нуклеотидов в пределах геномных координат, указанных в **Таблице 1**. В контексте данного документа термин «по меньшей мере 10 смежных нуклеотидов ± 10 нуклеотидов в пределах геномных координат» означает, например, по меньшей мере 10 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат, где геномные координаты включают 10 нуклеотидов в 5'-направлении и 10 нуклеотидов в 3'-направлении из диапазонов, перечисленных в **Таблице 1**. Например, CIITA-направленная РНК может содержать 10 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат chr16:10877360-10877380 или в пределах chr16:10877350-10877390, включая граничные нуклеотиды этих диапазонов. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит направляющую последовательность, которая представляет собой по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов последовательности, содержащей 10 смежных нуклеотидов ± 10 нуклеотидов геномных координат, указанных в **Таблице 1**. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит направляющую последовательность, которая по меньшей мере на 95%, 90% или 85% идентична последовательности, выбранной из последовательности, состоящей из 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов последовательности, содержащей 10 смежных нуклеотидов ± 10 нуклеотидов геномных координат, указанных в **Таблице 1**.

[00171] В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит направляющую последовательность, которая содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов ± 10 нуклеотидов в пределах геномных координат, указанных в **Таблице 1**. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит направляющую последовательность, которая содержит по меньшей мере 20 смежных нуклеотидов ± 10 нуклеотидов в пределах геномных координат, указанных в **Таблице 1**.

[00172] В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 3. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 4. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 6. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 7. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 8. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 9. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 10. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 11. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 12. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 14. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 15. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 16. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 17. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 18. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 19. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 20. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 21. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 22. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 23. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 24. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 25. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 26. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 27. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 28. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 29. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 30. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 31. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит

SEQ ID NO: 32. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 33. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 34. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 35. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 36. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 37. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 38. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 39. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 40. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 41. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 42. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 43. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 44. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 45. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 46. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 47. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 48. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 49. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 50. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 51. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 52. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 53. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 54. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 55. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 56. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 57. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 58. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 59. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 60. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 61. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 62. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 63. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 64. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 65. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 66. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 67. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 68. В некоторых вариантах осуществления

CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 69. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 70. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 71. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 72. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 73. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 74. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 75. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 76. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 77. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 78. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 79. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 80. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 81. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 82. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 83. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 84. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 85. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 86. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 87. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 88. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 89. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 90. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 91. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 92. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 93. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 94. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 95. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 96. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 97. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 98. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 99. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 100. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 101.

[00173] В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит нуклеотидную последовательность, выбранную из: SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 80, SEQ ID NO: 82, SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 87, SEQ ID NO: 91, SEQ ID NO: 96, SEQ ID NO: 97, SEQ ID NO: 98, SEQ ID NO: 100 и SEQ ID NO: 101.

[00174] В данном документе предложены дополнительные варианты осуществления CIITA-направленная РНК, включая, *например*, иллюстративные модификации направляющей РНК.

2. Генетические модификации CIITA

[00175] В некоторых вариантах осуществления способы и композиции, описанные в настоящем документе, генетически модифицируют по меньшей мере один нуклеотид сайта сплайсинга в гене CIITA в клетке. Поскольку белок CIITA регулирует экспрессию MHC класса II, в некоторых вариантах осуществления генетическая модификация CIITA изменяет продукцию белка CIITA и тем самым снижает экспрессию белка MHC класса II на поверхности генетически модифицированной клетки (или сконструированной клетки). Генетические модификации охватывают популяцию модификаций, возникающих в результате контакта с системой редактирования генов (*например*, совокупность редактирований, возникающих в результате действия Cas9 и CIITA-направленной РНК, или совокупность редактирований, возникающих в результате действия BC22 и CIITA-направленной РНК).

[00176] В некоторых вариантах осуществления генетическая модификация включает по меньшей мере один нуклеотид сайта сплайсинга в пределах геномных координат chr16:10902171-10923242. В некоторых вариантах осуществления генетическая модификация включает по меньшей мере один нуклеотид сайта сплайсинга в пределах геномных координат chr16:10903873-chr:10923242. В некоторых вариантах осуществления генетическая модификация включает по меньшей мере один нуклеотид сайта сплайсинга в пределах геномных координат chr:16:10906485-chr:10923242. В некоторых вариантах осуществления генетическая модификация включает по меньшей мере один нуклеотид сайта сплайсинга в пределах геномных координат chr16:10908130-chr:10923242.

[00177] В некоторых вариантах осуществления генетическая модификация включает по меньшей мере один нуклеотид сайта сплайсинга в пределах геномных координат, выбранных из: chr16:10908132-10908152, chr16:10908131-10908151, chr16:10916456-10916476, chr16:10918504-10918524, chr16:10909022-10909042, chr16:10918512-10918532, chr16:10918511-10918531, chr16:10895742-10895762, chr16:10916362-10916382, chr16:10916455-10916475, chr16:10909172-10909192, chr16:10906492-10906512, chr16:10909006-10909026, chr16:10922478-10922498, chr16:10895747-10895767, chr16:10916348-10916368, chr16:10910186-10910206, chr16:10906481-10906501, chr16:10909007-10909027, chr16:10895410-10895430 и chr16:10908130-10908150.

[00178] В некоторых вариантах осуществления генетическая модификация включает по меньшей мере один нуклеотид сайта сплайсинга в пределах геномных координат, выбранных из: chr16:10908132-10908152, chr16:10908131-10908151, chr16:10916456-10916476, chr16:10918504-10918524, chr16:10909022-10909042, chr16:10918512-10918532, chr16:10918511-10918531, chr16:10895742-10895762, chr16:10916362-10916382, chr16:10916455-10916475, chr16:10909172-10909192,

chr16:10906492-10906512, chr16:10909006-10909026 и chr16:10922478-10922498.

[00179] В некоторых вариантах осуществления генетическая модификация содержит по меньшей мере один нуклеотид сайта сплайсинга в пределах геномных координат, выбранных из: chr16:10908132-10908152, chr16:10908131-10908151, chr16:10916456-10916476 и chr16:10918504-10918524. В некоторых вариантах осуществления генетическая модификация включает по меньшей мере один нуклеотид сайта сплайсинга в пределах геномных координат chr16:10908132-10908152. В некоторых вариантах осуществления генетическая модификация включает по меньшей мере один нуклеотид сайта сплайсинга в пределах геномных координат chr16:10908131-10908151. В некоторых вариантах осуществления генетическая модификация включает по меньшей мере один нуклеотид сайта сплайсинга в пределах геномных координат chr16:10916456-10916476. В некоторых вариантах осуществления генетическая модификация включает по меньшей мере один нуклеотид сайта сплайсинга в пределах геномных координат chr16:10918504-10918524.

[00180] В некоторых вариантах осуществления генетическая модификация включает по меньшей мере один нуклеотид сайта сплайсинга в пределах геномных координат, выбранных из chr16:10918504-10918524, chr16:10923218-10923238, chr16:10923219-10923239, chr16:10923221-10923241, chr16:10906486-10906506, chr16:10906485-10906505, chr16:10903873-10903893, chr16:10909172-10909192, chr16:10918423-10918443, chr16:10916362-10916382, chr16:10916450-10916470, chr16:10922153-10922173, chr16:10923222-10923242, chr16:10910176-10910196, chr16:10895742-10895762, chr16:10916449-10916469, chr16:10923214-10923234, chr16:10906492-10906512, chr16:10906487-10906507.

[00181] В некоторых вариантах осуществления генетическая модификация включает по меньшей мере один нуклеотид сайта сплайсинга в пределах геномных координат, выбранных из: chr16:10918504-10918524, chr16:10923218-10923238, chr16:10923219-10923239, chr16:10923221-10923241, chr16:10906486-10906506, chr16:10906485-10906505, chr16:10903873-10903893, chr16:10909172-10909192, chr16:10918423-10918443, chr16:10916362-10916382, chr16:10916450-10916470 и chr16:10922153-10922173.

[00182] В некоторых вариантах осуществления генетическая модификация включает по меньшей мере один нуклеотид сайта сплайсинга в пределах геномных координат, выбранных из: chr16:10918504-10918524, chr16:10923218-10923238 и chr16:10923219-10923239. В некоторых вариантах осуществления генетическая модификация включает по меньшей мере один нуклеотид сайта сплайсинга в пределах геномных координат chr16:10918504-10918524. В некоторых вариантах осуществления генетическая модификация включает по меньшей мере один нуклеотид сайта сплайсинга в пределах геномных координат chr16:10923218-10923238. В некоторых вариантах осуществления генетическая модификация включает по меньшей мере один нуклеотид сайта сплайсинга в пределах геномных координат chr16:10923219-10923239.

[00183] В некоторых вариантах осуществления генетическая модификация включает по меньшей мере 5 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат chr16: 10902171-10923242. В некоторых вариантах осуществления генетическая модификация включает по меньшей мере 10 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат chr16: 10902171-10923242. В некоторых вариантах осуществления генетическая модификация включает по меньшей мере одну замену C на T или по меньшей мере одну замену A на G в пределах геномных координат chr16: 10902171-10923242.

[00184] В некоторых вариантах осуществления модификация CIITA включает любую одну или несколько из вставок, делеций, замен или дезаминирования по меньшей мере одного нуклеотида в целевой последовательности. В некоторых вариантах осуществления модификация CIITA включает вставку 1, 2, 3, 4 или 5 или более нуклеотидов в целевой последовательности. В некоторых вариантах осуществления модификация CIITA включает делецию 1, 2, 3, 4 или 5 или более нуклеотидов в целевой последовательности. В других вариантах осуществления модификация CIITA включает вставку 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20 или 25 или более нуклеотидов в целевой последовательности. В других вариантах осуществления модификация CIITA включает делецию 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20 или 25 или более нуклеотидов в целевой последовательности. В некоторых вариантах осуществления модификация CIITA содержит индел, который обычно определяется в данной области техники как вставка или делеция менее чем 1000 пар нуклеотидов (п.н.). В некоторых вариантах осуществления модификация CIITA содержит индел, который приводит к мутации со сдвигом рамки считывания в целевой последовательности. В некоторых вариантах осуществления модификация CIITA включает замену 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20 или 25 или более нуклеотидов в целевой последовательности. В некоторых вариантах осуществления модификация CIITA включает одну или несколько вставок, делеций или замен нуклеотидов в результате включения матричной нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления модификация CIITA включает вставку донорной нуклеиновой кислоты в целевую последовательность. В некоторых вариантах осуществления модификация CIITA не является временной.

[00185] В некоторых вариантах осуществления модифицирован по меньшей мере один нуклеотид сайта сплайсинга. В некоторых вариантах осуществления модифицирован по меньшей мере один нуклеотид акцепторного сайта сплайсинга. В некоторых вариантах осуществления модифицирован по меньшей мере один нуклеотид донорного сайта сплайсинга. В некоторых вариантах осуществления модифицирован нуклеотид, граничащий с акцепторным сайтом сплайсинга. В некоторых вариантах осуществления модифицирован нуклеотид, граничащий с донорным сайтом сплайсинга. В некоторых вариантах осуществления модифицирован один из консервативных нуклеотидов акцепторного сайта сплайсинга. В некоторых вариантах осуществления модифицирован консервативный нуклеотид акцепторного сайта сплайсинга, A. В некоторых вариантах осуществления модифицирован консервативный нуклеотид акцепторного сайта

сплайсинга, G. В некоторых вариантах осуществления модифицирован один из консервативных нуклеотидов донорного сайта сплайсинга. В некоторых вариантах осуществления модифицирован консервативный нуклеотид донорного сайта сплайсинга, G. В некоторых вариантах осуществления модифицирован консервативный нуклеотид донорного сайта сплайсинга, T.

[00186] В некоторых вариантах осуществления модифицирован нуклеотид расположен на расстоянии 5 нуклеотидов или менее от нуклеотида, граничащего с акцепторным сайтом сплайсинга. В некоторых вариантах осуществления модифицирован нуклеотид расположен на расстоянии 4 нуклеотидов или менее от нуклеотида, граничащего с акцепторным сайтом сплайсинга. В некоторых вариантах осуществления модифицирован нуклеотид расположен на расстоянии 3 нуклеотидов или менее от нуклеотида, граничащего с акцепторным сайтом сплайсинга. В некоторых вариантах осуществления модифицирован нуклеотид, расположенный на расстоянии 2 нуклеотидов или менее от нуклеотида, граничащего с акцепторным сайтом сплайсинга. В некоторых вариантах осуществления модифицирован нуклеотид, расположенный на расстоянии 1 нуклеотида или менее от нуклеотида, граничащего с акцепторным сайтом сплайсинга.

[00187] В некоторых вариантах осуществления модифицирован нуклеотид, расположенный на расстоянии 5 нуклеотидов или менее от нуклеотида, граничащего с донорным сайтом сплайсинга. В некоторых вариантах осуществления модифицирован нуклеотид, расположенный на расстоянии 4 нуклеотидов или менее от нуклеотида, граничащего с донорным сайтом сплайсинга. В некоторых вариантах осуществления модифицирован нуклеотид, расположенный на расстоянии 3 нуклеотидов или менее от нуклеотида, граничащего с донорным сайтом сплайсинга. В некоторых вариантах осуществления модифицирован нуклеотид, расположенный на расстоянии 2 нуклеотидов или менее от нуклеотида, граничащего с донорным сайтом сплайсинга. В некоторых вариантах осуществления модифицирован нуклеотид, расположенный на расстоянии 1 нуклеотида или менее от нуклеотида, граничащего с донорным сайтом сплайсинга.

[00188] В некоторых вариантах осуществления способы и композиции, описанные в данном документе, модифицируют сайт сплайсинга CIITA в клетке с использованием РНК-направляемого ДНК-связывающего агента (*например*, фермента Cas). В некоторых вариантах осуществления РНК-направляемый ДНК-связывающий агент представляет собой Cas9. В некоторых вариантах осуществления РНК-направляемый ДНК-связывающий агент разрезает CIITA на расстоянии 5 нуклеотидов или менее от нуклеотида, граничащего с сайтом сплайсинга, где CIITA-направленная РНК нацелена на геномную целевую последовательность CIITA, содержащую по меньшей мере 10 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат chr16:10902171-10923242. В некоторых вариантах осуществления РНК-направляемый ДНК-связывающий агент разрезает CIITA на расстоянии 4 нуклеотидов или менее от нуклеотида, граничащего с сайтом сплайсинга, где CIITA-направленная РНК нацелена на геномную целевую последовательность CIITA, содержащую по меньшей мере 10 смежных нуклеотидов в

пределах геномных координат chr16:10902171-10923242. В некоторых вариантах осуществления РНК-направляемый ДНК-связывающий агент разрезает CIITA на расстоянии 3 нуклеотидов или менее от нуклеотида, граничащего с сайтом сплайсинга, где CIITA-направленная РНК нацелена на геномную целевую последовательность CIITA, содержащую по меньшей мере 10 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат chr16:10902171-10923242. В некоторых вариантах осуществления РНК-направляемый ДНК-связывающий агент разрезает CIITA на расстоянии 2 нуклеотидов или менее от нуклеотида, граничащего с сайтом сплайсинга, где CIITA-направленная РНК нацелена на геномную целевую последовательность CIITA, содержащую по меньшей мере 10 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат chr16:10902171-10923242. В некоторых вариантах осуществления РНК-направляемый ДНК-связывающий агент разрезает CIITA на расстоянии 1 нуклеотид или менее от нуклеотида, граничащего с сайтом сплайсинга, где CIITA-направленная РНК нацелена на геномную целевую последовательность CIITA, содержащую по меньшей мере 10 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат chr16:10902171-10923242. В некоторых вариантах осуществления РНК-направляемый ДНК-связывающий агент разрезает CIITA по нуклеотиду, граничащему с сайтом сплайсинга, где CIITA-направленная РНК нацелена на геномную целевую последовательность CIITA, содержащую по меньшей мере 10 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат chr16:10902171-10923242. В некоторых вариантах осуществления нуклеотид, граничащий с сайтом сплайсинга, представляет собой нуклеотид, граничащий с акцепторным сайтом сплайсинга. В некоторых вариантах осуществления нуклеотид, граничащий с сайтом сплайсинга, является нуклеотидом, граничащим с донорным сайтом сплайсинга.

[00189] В некоторых вариантах осуществления генетическая модификация CIITA инактивирует сайт сплайсинга, *т. е.* сплайсинг не происходит в модифицированном сайте сплайсинга. В некоторых вариантах осуществления генетическая модификация CIITA инактивирует акцепторный сайт сплайсинга. В некоторых вариантах осуществления генетическая модификация CIITA инактивирует донорный сайт сплайсинга.

[00190] В некоторых вариантах осуществления генетическая модификация сайта сплайсинга CIITA удаляет все три нуклеотида сайта сплайсинга. В некоторых вариантах осуществления генетическая модификация удаляет 2 нуклеотида сайта сплайсинга. В некоторых вариантах осуществления генетическая модификация удаляет 1 нуклеотид сайта сплайсинга. В некоторых вариантах осуществления генетическая модификация сайта сплайсинга CIITA удаляет 1 или 2 нуклеотида акцепторного сайта сплайсинга. В некоторых вариантах осуществления генетическая модификация сайта сплайсинга CIITA удаляет 1 или 2 нуклеотида донорного сайта сплайсинга. В некоторых вариантах осуществления удален по меньшей мере 1 нуклеотид сайта сплайсинга. В некоторых вариантах осуществления удалено по меньшей мере 2 нуклеотида сайта сплайсинга. В некоторых вариантах осуществления удален нуклеотид, граничащий с акцепторным сайтом сплайсинга. В некоторых вариантах осуществления удален нуклеотид, граничный

с донорным сайтом сплайсинга.

[00191] В некоторых вариантах осуществления генетическая модификация CIITA приводит к использованию стоп-кодона вне рамки считывания. В некоторых вариантах осуществления генетическая модификация CIITA приводит к пропуску экзона во время сплайсинга. В некоторых вариантах осуществления генетическая модификация CIITA приводит к снижению экспрессии белка CIITA клеткой. В некоторых вариантах осуществления генетическая модификация CIITA приводит к снижению CIITA в ядре клетки. В некоторых вариантах осуществления модификация сайта сплайсинга CIITA приводит к снижению экспрессии белка MHC класса II на поверхности клетки.

[00192] В некоторых вариантах осуществления генетическая модификация CIITA приводит к усеченной форме белка CIITA. В некоторых вариантах осуществления усеченный белок CIITA не связывается с GTP. В некоторых вариантах осуществления усеченный белок CIITA не локализуется в ядре. В некоторых вариантах осуществления белок CIITA (*например*, усеченная форма белка CIITA) имеет нарушенную активность по сравнению с активностью белка CIITA дикого типа в отношении регуляции экспрессии MHC класса II. В некоторых вариантах осуществления экспрессия MHC класса II на поверхности клетки снижена в результате нарушения активности белка CIITA. В некоторых вариантах осуществления экспрессия MHC класса II на поверхности клетки отсутствует в результате нарушения активности белка CIITA.

3. Эффективность CIITA-направленных РНК

[00193] Эффективность CIITA-направленных РНК можно определить с помощью методов, доступных в данной области техники, которые оценивают эффективность редактирования направляющей РНК, уровни белка CIITA и/или мРНК, и/или уровни MHC класса II в целевой клетке. В некоторых вариантах осуществления снижение или устранение белка HLA-A на поверхности клетки можно определить путем сравнения с немодифицированной клеткой (или «относительно немодифицированной клетки»). Сконструированную клетку или популяцию клеток также можно сравнить с популяцией немодифицированных клеток.

[00194] В некоторых вариантах осуществления эффективность CIITA-направленной РНК определяют путем измерения уровней белка CIITA в клетке. Уровни белка CIITA можно определить, *например*, с помощью клеточного лизата и вестерн-блоттинга с антителом к CIITA. В некоторых вариантах осуществления эффективность CIITA-направленной РНК определяют путем измерения уровней белка CIITA в ядре клетки. В некоторых вариантах осуществления эффективность CIITA-направленной РНК определяют путем измерения уровней мРНК CIITA в клетке. Уровни мРНК CIITA можно определить, *например*, с помощью ОТ-ПЦР. В некоторых вариантах осуществления снижение уровней белка CIITA и/или мРНК CIITA в целевой клетке по сравнению с немодифицированной клеткой свидетельствует об эффективном сайт сплайсинга CIITA-направленной РНК.

[00195] «Немодифицированная клетка» (или «немодифицированные клетки»)

относится к контрольной клетке (или клеткам) того же типа клеток в эксперименте или тесте, где «немодифицированная» контрольная клетка не контактировала с CIITA-направленной РНК (т.е., несконструированная клетка). Следовательно, немодифицированная клетка (или клетки) может быть клеткой, которая не контактировала с направляющей РНК, или клеткой, которая контактировала с направляющей РНК, которая не нацелена на CIITA.

[00196] В некоторых вариантах осуществления эффективность CIITA-направленной РНК определяют путем измерения снижения или устранения экспрессии белка МНС класса II целевыми клетками. Белок CIITA действует как трансактиватор, активируя промотор МНС класса II, и необходим для экспрессии белка МНС класса II. В некоторых вариантах осуществления экспрессия белка МНС класса II может быть обнаружена на поверхности целевых клеток. В некоторых вариантах осуществления экспрессию белка МНС класса II измеряют с помощью проточной цитометрии. В некоторых вариантах осуществления можно использовать антитело к белку МНС класса II (*например*, к HLA-DR, DQ, DP) для обнаружения экспрессии белка МНС класса II, *например*, с помощью проточной цитометрии. В некоторых вариантах осуществления снижение или устранение белка МНС класса II на поверхности клетки (или популяции клеток) по сравнению с немодифицированной клеткой (или популяцией немодифицированных клеток) свидетельствует об эффективной CIITA-направленной РНК. В некоторых вариантах осуществления клетка (или популяция клеток), контактировавшая с конкретной CIITA-направленной РНК и РНК-направляемым ДНК-связывающим агентом, которая является отрицательной в отношении белка МНС класса II по данным проточной цитометрии, свидетельствует об эффективной CIITA-направленной РНК.

[00197] В некоторых вариантах осуществления экспрессия белка МНС класса II снижается или устраняется в популяции клеток с применением описанных в данном документе способов и композиций. В некоторых вариантах осуществления популяция клеток обогащена (например, с помощью FACS или MACS) и по меньшей мере на 65%, 70%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93% или 94% является отрицательной по МНС класса II по данным проточной цитометрии относительно популяции немодифицированных клеток. В некоторых вариантах осуществления популяция клеток не обогащена (например, с помощью FACS или MACS) и по меньшей мере на 65%, 70%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93% или 94% является отрицательной по МНС класса II по данным проточной цитометрии относительно популяции немодифицированных клеток.

[00198] В некоторых вариантах осуществления популяция клеток по меньшей мере на 65% является отрицательной по МНС класса II, как измерено с помощью проточной цитометрии, относительно популяции немодифицированных клеток. В некоторых вариантах осуществления популяция клеток по меньшей мере на 70% является отрицательной по МНС класса II, как измерено с помощью проточной цитометрии, относительно популяции немодифицированных клеток. В некоторых вариантах

осуществления популяция клеток по меньшей мере на 80% является отрицательной по МНС класса II, как измерено с помощью проточной цитометрии, относительно популяции немодифицированных клеток. В некоторых вариантах осуществления популяция клеток по меньшей мере на 90% является отрицательной по МНС класса II, как измерено с помощью проточной цитометрии, относительно популяции немодифицированных клеток. В некоторых вариантах осуществления популяция клеток по меньшей мере на 91% является отрицательной по МНС класса II, как измерено с помощью проточной цитометрии, относительно популяции немодифицированных клеток. В некоторых вариантах осуществления популяция клеток по меньшей мере на 92% является отрицательной по МНС класса II, как измерено с помощью проточной цитометрии, относительно популяции немодифицированных клеток. В некоторых вариантах осуществления популяция клеток по меньшей мере на 93% является отрицательной по МНС класса II, как измерено с помощью проточной цитометрии, относительно популяции немодифицированных клеток. В некоторых вариантах осуществления популяция клеток по меньшей мере на 94% является отрицательной по МНС класса II, как измерено с помощью проточной цитометрии, относительно популяции немодифицированных клеток.

[00199] В некоторых вариантах осуществления эффективность CIITA-направленной РНК (*т. е.* активность направляющей РНК) связана с расстоянием между сайтом разреза в геномной целевой последовательности (*например*, образованным Cas9) относительно нуклеотида, граничащего с сайтом сплайсинга в CIITA. В некоторых вариантах осуществления существует корреляция между расстоянием (рассчитываемым как количество нуклеотидов между сайтом разреза и нуклеотидом, граничащим с сайтом сплайсинга) и потерей экспрессии МНС класса II. В некоторых вариантах осуществления чем короче расстояние между нуклеотидом, граничащим с сайтом сплайсинга, и сайтом разреза (*например*, образованным Cas9), тем больше снижается экспрессия МНС класса II целевой клеткой. В некоторых вариантах осуществления расстояние между нуклеотидом, граничащим с сайтом сплайсинга, в CIITA и сайтом разреза в геномной целевой последовательности составляет 5 нуклеотидов или менее, 4 нуклеотида или менее, 3 нуклеотида или менее, 2 нуклеотида или менее или 1 нуклеотид или менее. В некоторых вариантах осуществления сайт разреза расположен на 5'-конце нуклеотида, граничащего с сайтом сплайсинга. В некоторых вариантах осуществления сайт разреза расположен на 3'-конце нуклеотида, граничащего с сайтом сплайсинга. В некоторых вариантах осуществления нуклеотид, граничащий с сайтом сплайсинга CIITA, представляет собой нуклеотид, граничащий с акцепторным сайтом сплайсинга. В некоторых вариантах осуществления нуклеотид, граничащий с сайтом сплайсинга CIITA, представляет собой нуклеотид, граничащий с донорным сайтом сплайсинга.

[00200] В некоторых вариантах осуществления эффективная CIITA-направленная РНК может быть определена путем измерения ответа иммунных клеток in vitro или in vivo (*например*, CD4+ Т-клеток) на генетически модифицированную целевую клетку. Реакцию CD4+ Т-клеток можно оценить с помощью анализа, который измеряет активационную

реакцию CD4+ Т-клеток, *например*, пролиферацию CD4+ Т-клеток, экспрессию маркеров активации и/или продукцию цитокинов (IL-2, IL-12, IFN-γ) (*например*, проточная цитометрия, ELISA). Реакцию CD4+ Т-клеток можно оценить в анализах клеточных культур in vitro, в которых генетически модифицированную клетку культивируют совместно с клетками, содержащими CD4+ Т-клетки. Например, генетически модифицированную клетку можно культивировать совместно, *например*, с PBMC, очищенными CD3+ Т-клетками, содержащими CD4+ Т-клетки, очищенными CD4+ Т-клетками или линией CD4+ Т-клеток. Ответ CD4+ Т-клеток, вызванную генетически модифицированной клеткой, можно сравнить с ответом, вызванным немодифицированной клеткой. Сниженный ответ CD4+ Т-клеток свидетельствует об эффективной CIITA-направленной РНК.

[00201] Эффективность CIITA-направленной РНК можно также оценить по выживаемости клеток после редактирования. В некоторых вариантах осуществления клетка выживает после редактирования в течение по меньшей мере от одной недели до шести недель. В некоторых вариантах осуществления клетка выживает после редактирования в течение по меньшей мере от одной недели до двенадцати недель. В некоторых вариантах осуществления клетка выживает после редактирования в течение по меньшей мере двух недель. В некоторых вариантах осуществления клетка выживает после редактирования в течение по меньшей мере трех недель. В некоторых вариантах осуществления клетка выживает после редактирования в течение по меньшей мере четырех недель. В некоторых вариантах осуществления клетка выживает после редактирования в течение по меньшей мере пяти недель. В некоторых вариантах осуществления клетка выживает после редактирования в течение по меньшей мере шести недель. Жизнеспособность генетически модифицированной клетки можно измерить с применением стандартных методов, включая, *например*, измерение гибели клеток, окрашивание живых/мертвых клеток с помощью проточной цитометрии или пролиферацию клеток.

Способы и композиции для снижения или устранения MHC класса II и дополнительные модификации

1. Нокаут MHC класса I

[00202] В некоторых вариантах осуществления предложены способы снижения или устранения экспрессии белка MHC класса II на поверхности клетки путем генетической модификации CIITA, как описано в данном документе, где способы дополнительно обеспечивают снижение или устранение экспрессии белка MHC класса I на поверхности клетки по отношению к немодифицированной клетке. В одном подходе экспрессия белка MHC класса I снижается или устраняется путем генетической модификации гена B2M. В некоторых вариантах осуществления экспрессия белка MHC класса I снижается или устраняется путем приведения в контакт клетки с B2M-направленной РНК. В другом подходе экспрессия белка MHC класса I HLA-A снижается или устраняется путем генетической модификации HLA-A, тем самым снижая или устраняя поверхностную

экспрессию HLA-A в клетке человека, где клетка человека является гомозиготной по HLA-B и гомозиготной по HLA-C. Следовательно, в некоторых вариантах осуществления экспрессия белка HLA-A снижается или устраняется путем приведения в контакт клетки человека с HLA-A-направленной РНК, где клетка человека является гомозиготной по HLA-B и гомозиготной по HLA-C. В некоторых вариантах осуществления полученная клетка представляет собой аллогенную клетку.

[00203] В некоторых вариантах осуществления способы включают снижение экспрессии белка МНС класса II на поверхности клетки, включая генетическую модификацию CIITA, включающую приведение клетки в контакт с композицией, содержащей CIITA-направленную РНК, описанную в данном документе, где способ дополнительно включает приведение клетки в контакт с B2M-направленной РНК. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает приведение клетки в контакт с РНК-направляемым ДНК-связывающим агентом. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает индукцию DSB или SSB в целевой последовательности B2M. В некоторых вариантах осуществления в клетке снижена экспрессия B2M. В некоторых вариантах осуществления в клетке снижена экспрессия белка МНС класса I.

[00204] В некоторых вариантах осуществления способы включают инактивацию сайта сплайсинга в CIITA, включая приведение в контакт клетки с композицией, содержащей CIITA-направленную РНК, описанную в данном документе, где способ дополнительно включает приведение в контакт клетки с B2M-направленной РНК. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает приведение клетки в контакт с РНК-направляемым ДНК-связывающим агентом. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает индукцию DSB или SSB в целевой последовательности B2M. В некоторых вариантах осуществления в клетке снижена экспрессия B2M. В некоторых вариантах осуществления в клетке снижена экспрессия белка МНС класса I.

[00205] В некоторых вариантах осуществления способы включают индукцию DSB или SSB в CIITA, включая приведение клетки в контакт с композицией, содержащей CIITA-направленную РНК, описанную в данном документе, причем способ дополнительно включает приведение клетки в контакт с B2M-направленной РНК. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает приведение клетки в контакт с РНК-направляемым ДНК-связывающим агентом. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает индукцию DSB или SSB в целевой последовательности B2M. В некоторых вариантах осуществления в клетке снижена экспрессия B2M. В некоторых вариантах осуществления в клетке снижена экспрессия белка МНС класса I.

[00206] В некоторых вариантах осуществления способы включают снижение экспрессии белка CIITA в клетке, включая доставку композиции в клетку, содержащую CIITA-направленную РНК, описанную в данном документе, где способ дополнительно

включает приведение клетки в контакт с B2M-направленной РНК. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает приведение клетки в контакт с РНК-направляемым ДНК-связывающим агентом. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает индукцию DSB или SSB в целевой последовательности B2M. В некоторых вариантах осуществления в клетке снижена экспрессия B2M. В некоторых вариантах осуществления в клетке снижена экспрессия белка MHC класса I.

[00207] В некоторых вариантах осуществления B2M-направленная РНК нацелена на ген B2M человека.

[00208] В некоторых вариантах осуществления B2M-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 701. В некоторых вариантах осуществления B2M-направленная РНК содержит направляющую последовательность, которая представляет собой по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов SEQ ID NO: 701. В некоторых вариантах осуществления B2M-направленная РНК содержит направляющую последовательность, которая по меньшей мере на 95%, 90% или 85% идентична SEQ ID NO: 701.

[00209] В данном документе предложены дополнительные варианты осуществления B2M-направленных РНК, включая, *например*, иллюстративные модификации направляющей РНК.

[00210] В некоторых вариантах осуществления эффективность B2M-направленной РНК определяют путем измерения уровней белка B2M в клетке по сравнению с немодифицированной клеткой. В некоторых вариантах осуществления эффективность B2M-направленной РНК определяют путем измерения уровней белка B2M, экспрессируемого клеткой. В некоторых вариантах осуществления антитело к белку B2M (*например*, анти-B2M) можно использовать для определения уровня белка B2M, *например*, с помощью проточной цитометрии. В некоторых вариантах осуществления эффективность B2M-направленной РНК определяют путем измерения уровней мРНК B2M в клетке, *например*, с помощью ОТ-ПЦР. В некоторых вариантах осуществления снижение или устранение уровней белка B2M или мРНК B2M свидетельствует об эффективной B2M-направленной РНК по сравнению с уровнями белка B2M в немодифицированной клетке. В некоторых вариантах осуществления клетка (или популяция клеток), отрицательная по белку B2M по данным проточной цитометрии по сравнению с немодифицированной клеткой (или популяцией немодифицированных клеток), указывает на наличие эффективной B2M-направленной РНК. В некоторых вариантах осуществления клетка (или популяция клеток), контактировавшая с конкретной B2M-направленной РНК и РНК-направляемым ДНК-связывающим агентом, которая является отрицательной в отношении белка MHC класса I по данным проточной цитометрии, свидетельствует об эффективной B2M-направленной РНК.

[00211] В некоторых вариантах осуществления эффективность B2M-направленной РНК определяют путем измерения уровней белка MHC класса I на поверхности клетки. В некоторых вариантах осуществления уровни белка MHC класса I измеряют с помощью проточной цитометрии (*например*, с антителом к HLA-A, HLA-B или HLA-C). В

некоторых вариантах осуществления популяция клеток является по меньшей мере на 65% отрицательной по MHC I, как измерено с помощью проточной цитометрии, относительно популяции немодифицированных клеток. В некоторых вариантах осуществления популяция клеток является по меньшей мере на 70% отрицательной по MHC I, как измерено с помощью проточной цитометрии, относительно популяции немодифицированных клеток. В некоторых вариантах осуществления популяция клеток по меньшей мере на 80% является отрицательной по MHC класса I, как измерено с помощью проточной цитометрии, относительно популяции немодифицированных клеток. В некоторых вариантах осуществления популяция клеток является по меньшей мере на 90% отрицательной по MHC I, как измерено с помощью проточной цитометрии, относительно популяции немодифицированных клеток. В некоторых вариантах осуществления популяция клеток является по меньшей мере на 95% отрицательной по MHC I, как измерено с помощью проточной цитометрии, относительно популяции немодифицированных клеток. В некоторых вариантах осуществления популяция клеток по меньшей мере на 100% является отрицательной по MHC класса I, как измерено с помощью проточной цитометрии, относительно популяции немодифицированных клеток.

[00212] В некоторых вариантах осуществления способы включают снижение или устранение поверхностной экспрессии белка MHC класса II в сконструированной клетке по сравнению с немодифицированной клеткой, включая приведение клетки в контакт с композицией, содержащей CIITA-направленную РНК, описанную в данном документе, где способ, дополнительно включает снижение или устранение экспрессии HLA-A в клетке с помощью системы редактирования генов, которая связывается с геномной целевой последовательностью HLA-A, содержащей по меньшей мере 5 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат, выбранных из: chr6:29942864-29942884; chr6:29942868-29942888; chr6:29942876-29942896; chr6:29942877-29942897; chr6:29942883-29942903; chr6:29943126-29943146; chr6:29943528-29943548; chr6:29943529-29943549; chr6:29943530-29943550; chr6:29943537-29943557; chr6:29943549-29943569; chr6:29943589-29943609 и chr6:29944026-29944046. В некоторых вариантах осуществления способы включают снижение или устранение поверхностной экспрессии белка MHC класса II в сконструированной клетке по сравнению с немодифицированной клеткой, включая приведение клетки в контакт с композицией, содержащей CIITA-направленную РНК, описанную в данном документе, где способ, дополнительно включает снижение или устранение экспрессии HLA-A в клетке с помощью системы редактирования генов, которая связывается с геномной целевой последовательностью HLA-A, содержащей по меньшей мере 10 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат, выбранных из: chr6:29942864-29942884; chr6:29942868-29942888; chr6:29942876-29942896; chr6:29942877-29942897; chr6:29942883-29942903; chr6:29943126-29943146; chr6:29943528-29943548; chr6:29943529-29943549; chr6:29943530-29943550; chr6:29943537-29943557; chr6:29943549-29943569; chr6:29943589-29943609 и chr6:29944026-29944046. В некоторых вариантах

осуществления геномные координаты HLA-A выбирают из chr6:29942864-29942884. В некоторых вариантах осуществления геномные координаты HLA-A выбирают из chr6:29942868-29942888. В некоторых вариантах осуществления геномные координаты HLA-A выбирают из chr6:29942876-29942896. В некоторых вариантах осуществления геномные координаты HLA-A выбирают из chr6:29942877-29942897. В некоторых вариантах осуществления геномные координаты HLA-A выбирают из chr6:29942883-29942903. В некоторых вариантах осуществления геномные координаты HLA-A выбирают из chr6:29943126-29943146. В некоторых вариантах осуществления геномные координаты HLA-A выбирают из chr6:29943528-29943548. В некоторых вариантах осуществления геномные координаты HLA-A выбирают из chr6:29943529-29943549. В некоторых вариантах осуществления геномные координаты HLA-A выбирают из chr6:29943530-29943550. В некоторых вариантах осуществления геномные координаты HLA-A выбирают из chr6:29943537-29943557. В некоторых вариантах осуществления геномные координаты HLA-A выбирают из chr6:29943549-29943569. В некоторых вариантах осуществления геномные координаты HLA-A выбирают из chr6:29943589-29943609. В некоторых вариантах осуществления геномные координаты HLA-A выбирают из chr6:29944026-29944046. В некоторых вариантах осуществления система редактирования генов содержит РНК-направляемый ДНК-связывающий агент. В некоторых вариантах осуществления РНК-направляемый ДНК-связывающий агент содержит белок Cas9, такой как Cas9 S. pyogenes. В некоторых вариантах осуществления клетка является гомозиготной по HLA-B и гомозиготной по HLA-C.

[00213] В некоторых вариантах осуществления способы включают снижение или устранение поверхностной экспрессии белка MHC класса II в сконструированной клетке по сравнению с немодифицированной клеткой, включая приведение клетки в контакт с композицией, содержащей CIITA-направленную РНК, описанную в данном документе, где способ дополнительно включает приведение клетки в контакт с HLA-A-направленной РНК. В некоторых вариантах осуществления HLA-A-направленная РНК содержит направляющую последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 2001-2095 (с соответствующими последовательностями направляющей РНК, SEQ ID NO: 1811-1905 и 1906-2000) (см. **Таблицу 2** ниже). В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает приведение клетки в контакт с РНК-направляемым ДНК-связывающим агентом. В некоторых вариантах осуществления РНК-направляемый ДНК-связывающий агент содержит белок Cas9, такой как Cas9 S. pyogenes. В некоторых вариантах осуществления клетка является гомозиготной по HLA-B и гомозиготной по HLA-C.

[00214] В некоторых вариантах осуществления предложены способы получения сконструированной клетки, в которой снижена или устранена поверхностная экспрессия белка MHC класса II по сравнению с немодифицированной клеткой, включающие: a. приведение клетки в контакт с CIITA-направленной РНК, где направляющая РНК содержит направляющую последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1-117; и b.

приведение клетки в контакт с HLA-A-направленной РНК, где HLA-A-направленная РНК содержит направляющую последовательность, выбранную из любой из SEQ ID NO: 2001-2095 (с соответствующими последовательностями направляющей РНК SEQ ID NO: 1811-1905 и 1906- 2000) (см. **Таблицу 2** ниже); и с. необязательно приведение клетки в контакт с РНК-направляемым ДНК-связывающим агентом или нуклеиновой кислотой, кодирующей РНК-направляемый ДНК-связывающий агент; где в клетке снижена или устранена поверхностная экспрессия HLA-A в клетке по сравнению с немодифицированной клеткой. В некоторых вариантах осуществления способ включает приведение клетки в контакт с РНК-направляемым ДНК-связывающим агентом или нуклеиновой кислотой, кодирующей РНК-направляемый ДНК-связывающий агент. В некоторых вариантах осуществления РНК-направляемый ДНК-связывающий агент содержит Cas9 S. pyogenes. В некоторых вариантах осуществления клетка является гомозиготной по HLA-B и гомозиготной по HLA-C.

[00215] Примеры HLA-A-направленных РНК представлены в **Таблице 2** (направляющие последовательности SEQ ID NO: 2001-2095 (с соответствующими направляющими последовательностями РНК SEQ ID NO: 1811-1905 и 1906-2000).

[00216] **Таблица 2. Примеры HLA-A-направленной РНК**

Идентификатор направляющей послед-ти	**SEQ ID NO к направляющей последовательности**	**Направляющая последовательность**	**Примеры Полная последовательность** (SEQ ID NO: 1811-1905)	**Примерная Mod-последовательность** (четыре концевых остатка U являются необязательными и могут включать 0, 1, 2, 3, 4 или большее количество остатков U) (SEQ ID NO: 1906-2000)	**Геномные координаты**
G018983	2001	UGGAGGGC CUGAUGUG UGUU	UGGAGGGCCUG AUGUGUGUUGU UUUAGAGCUAG AAAUAGCAAGU UAAAAUAAGGC UAGUCCGUUAU CAACUUGAAAA AGUGGCACCGA GUCGGUGCUUU	mU*mG*mG*AG GGCCUGAUGUG UGUUGUUUUAG AmGmCmUmAm GmAmAmAmUm AmGmCAAGUU AAAAUAAGGCU AGUCCGUUAUC AmAmCmUmUm	chr6:2994529 0-29945310 (несоответст вие hg38=2)

			U	GmAmAmAmAm AmGmUmGmGm CmAmCmCmGm AmGmUmCmGm GmUmGmCmU*m U*mU*mU	
G018984	2002	GCCUGAUG UGUGUUGG GUGU	GCCUGAUGUGU GUUGGGUGUGU UUUAGAGCUAG AAAUAGCAAGU UAAAAUAAGGC UAGUCCGUUAU CAACUUGAAAA AGUGGCACCGA GUCGGUGCUUU U	mG*mC*mC*UG AUGUGUGUUGG GUGUGUUUUAG AmGmCmUmAm GmAmAmAmUm AmGmCAAGUU AAAAUAAGGCU AGUCCGUUAUC AmAmCmUmUm GmAmAmAmAm AmGmUmGmGm CmAmCmCmGm AmGmUmCmGm GmUmGmCmU*m U*mU*mU	chr6:2994529 6-29945316 (несоответст вие hg38=2)
G018985	2003	CCUGAUGU GUGUUGGG UGUU	CCUGAUGUGUG UUGGGUGUUGU UUUAGAGCUAG AAAUAGCAAGU UAAAAUAAGGC UAGUCCGUUAU CAACUUGAAAA AGUGGCACCGA GUCGGUGCUUU U	mC*mC*mU*GA UGUGUGUUGGG UGUUGUUUUAG AmGmCmUmAm GmAmAmAmUm AmGmCAAGUU AAAAUAAGGCU AGUCCGUUAUC AmAmCmUmUm GmAmAmAmAm AmGmUmGmGm CmAmCmCmGm AmGmUmCmGm GmUmGmCmU*m	chr6:2994529 7-29945317 (несоответст вие hg38=1)

				U*mU*mU	
G018986	2004	CCCAACACCCAACACACAUC	CCCAACACCCAACACACAUCGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU	mC*mC*mC*AACACCCAACACACAUCGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	chr6:29945300-29945320 (несоответствие hg38=1)
G018965	2005	UCAGGAAACAUGAAGAAAGC	UCAGGAAACAUGAAGAAAGCGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU	mU*mC*mA*GGAAACAUGAAGAAAGCGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	chr6:29890117-29890137
G019018	2006	AGGCGCCUGGGCCUCUCCCG	AGGCGCCUGGGCCUCUCCCGGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGU	mA*mG*mG*CGCCUGGGCCUCUCCCGGUUUUAGAmGmCmUmAm	chr6:29927058-29927078

			UAAAAUAAGGC UAGUCCGUUAU CAACUUGAAAA AGUGGCACCGA GUCGGUGCUUU U	GmAmAmAmUm AmGmCAAGUU AAAAUAAGGCU AGUCCGUUAUC AmAmCmUmUm GmAmAmAmAm AmGmUmGmGm CmAmCmCmGm AmGmUmCmGm GmUmGmCmU*m U*mU*mU	
G018937	2007	CGGGCUGG CCUCCCACA AGG	CGGGCUGGCCU CCCACAAGGGU UUUAGAGCUAG AAAUAGCAAGU UAAAAUAAGGC UAGUCCGUUAU CAACUUGAAAA AGUGGCACCGA GUCGGUGCUUU U	mC*mG*mG*GC UGGCCUCCCAC AAGGGUUUUAG AmGmCmUmAm GmAmAmAmUm AmGmCAAGUU AAAAUAAGGCU AGUCCGUUAUC AmAmCmUmUm GmAmAmAmAm AmGmUmGmGm CmAmCmCmGm AmGmUmCmGm GmUmGmCmU*m U*mU*mU	chr6:2993433 0-29934350
G018990	2008	ACGGCCAU CCUCGGCG UCUG	ACGGCCAUCCU CGGCGUCUGGU UUUAGAGCUAG AAAUAGCAAGU UAAAAUAAGGC UAGUCCGUUAU CAACUUGAAAA AGUGGCACCGA GUCGGUGCUUU	mA*mC*mG*GC CAUCCUCGGCG UCUGGUUUUAG AmGmCmUmAm GmAmAmAmUm AmGmCAAGUU AAAAUAAGGCU AGUCCGUUAUC AmAmCmUmUm	chr6:2994254 1-29942561

			U	GmAmAmAmAm AmGmUmGmGm CmAmCmCmGm AmGmUmCmGm GmUmGmCmU*m U*mU*mU	
G018991	2009	GACGGCCA UCCUCGGC GUCU	GACGGCCAUCC UCGGCGUCUGU UUUAGAGCUAG AAAUAGCAAGU UAAAAUAAGGC UAGUCCGUUAU CAACUUGAAAA AGUGGCACCGA GUCGGUGCUUU U	mG*mA*mC*GG CCAUCCUCGGC GUCUGUUUUAG AmGmCmUmAm GmAmAmAmUm AmGmCAAGUU AAAAUAAGGCU AGUCCGUUAUC AmAmCmUmUm GmAmAmAmAm AmGmUmGmGm CmAmCmCmGm AmGmUmCmGm GmUmGmCmU*m U*mU*mU	chr6:2994254 2-29942562
G018992	2010	GACGCCGA GGAUGGCC GUCA	GACGCCGAGGA UGGCCGUCAGU UUUAGAGCUAG AAAUAGCAAGU UAAAAUAAGGC UAGUCCGUUAU CAACUUGAAAA AGUGGCACCGA GUCGGUGCUUU U	mG*mA*mC*GC CGAGGAUGGCC GUCAGUUUUAG AmGmCmUmAm GmAmAmAmUm AmGmCAAGUU AAAAUAAGGCU AGUCCGUUAUC AmAmCmUmUm GmAmAmAmAm AmGmUmGmGm CmAmCmCmGm AmGmUmCmGm GmUmGmCmU*m	chr6:2994254 3-29942563

				U*mU*mU	
G018993	2011	UGACGGCCAUCCUCGGCGUC	UGACGGCCAUCCUCGGCGUCGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU	mU*mG*mA*CGGCCAUCCUCGGCGUCGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	chr6:29942543-29942563
G018994	2012	GGCGCCAUGACGGCCAUCCU	GGCGCCAUGACGGCCAUCCUGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU	mG*mG*mC*GCCAUGACGGCCAUCCUGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	chr6:29942550-29942570
G018995	2013	ACAGCGACGCCGCGAGCCAG	ACAGCGACGCCGCGAGCCAGGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGU	mA*mC*mA*GCGACGCCGCGAGCCAGGUUUUAGAmGmCmUmAm	chr6:29942864-29942884

			UAAAAUAAGGC UAGUCCGUUAU CAACUUGAAAA AGUGGCACCGA GUCGGUGCUUU U	GmAmAmAmUm AmGmCAAGUU AAAAUAAGGCU AGUCCGUUAUC AmAmCmUmUm GmAmAmAmAm AmGmUmGmGm CmAmCmCmGm AmGmUmCmGm GmUmGmCmU*m U*mU*mU	
G018996	2014	CGACGCCG CGAGCCAG AGGA	CGACGCCGCGA GCCAGAGGAGU UUUAGAGCUAG AAAUAGCAAGU UAAAAUAAGGC UAGUCCGUUAU CAACUUGAAAA AGUGGCACCGA GUCGGUGCUUU U	mC*mG*mA*CG CCGCGAGCCAG AGGAGUUUUAG AmGmCmUmAm GmAmAmAmUm AmGmCAAGUU AAAAUAAGGCU AGUCCGUUAUC AmAmCmUmUm GmAmAmAmAm AmGmUmGmGm CmAmCmCmGm AmGmUmCmGm GmUmGmCmU*m U*mU*mU	chr6:2994286 8-29942888
G018997	2015	CGAGCCAG AGGAUGGA GCCG	CGAGCCAGAGG AUGGAGCCGGU UUUAGAGCUAG AAAUAGCAAGU UAAAAUAAGGC UAGUCCGUUAU CAACUUGAAAA AGUGGCACCGA GUCGGUGCUUU	mC*mG*mA*GC CAGAGGAUGGA GCCGGUUUUAG AmGmCmUmAm GmAmAmAmUm AmGmCAAGUU AAAAUAAGGCU AGUCCGUUAUC AmAmCmUmUm	chr6:2994287 6-29942896

			U	GmAmAmAmAm AmGmUmGmGm CmAmCmCmGm AmGmUmCmGm GmUmGmCmU*m U*mU*mU	
G018998	2016	CGGCUCCA UCCUCUGG CUCG	CGGCUCCAUCC UCUGGCUCGGU UUUAGAGCUAG AAAUAGCAAGU UAAAAUAAGGC UAGUCCGUUAU CAACUUGAAAA AGUGGCACCGA GUCGGUGCUUU U	mC*mG*mG*CU CCAUCCUCUGG CUCGGUUUUAG AmGmCmUmAm GmAmAmAmUm AmGmCAAGUU AAAAUAAGGCU AGUCCGUUAUC AmAmCmUmUm GmAmAmAmAm AmGmUmGmGm CmAmCmCmGm AmGmUmCmGm GmUmGmCmU*m U*mU*mU	chr6:2994287 6-29942896
G018999	2017	GAGCCAGA GGAUGGAG CCGC	GAGCCAGAGGA UGGAGCCGCGU UUUAGAGCUAG AAAUAGCAAGU UAAAAUAAGGC UAGUCCGUUAU CAACUUGAAAA AGUGGCACCGA GUCGGUGCUUU U	mG*mA*mG*CC AGAGGAUGGAG CCGCGUUUUAG AmGmCmUmAm GmAmAmAmUm AmGmCAAGUU AAAAUAAGGCU AGUCCGUUAUC AmAmCmUmUm GmAmAmAmAm AmGmUmGmGm CmAmCmCmGm AmGmUmCmGm GmUmGmCmU*m	chr6:2994287 7-29942897

				U*mU*mU	
G019000	2018	GCGCCCGCGGCUCCAUCCUC	GCGCCCGCGGCUCCAUCCUCGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUU	mG*mC*mG*CCCGCGGCUCCAUCCUCGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	chr6:29942883-29942903
G019001	2019	GCCCGUCCGUGGGGGAUGAG	GCCCGUCCGUGGGGGAUGAGGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUU	mG*mC*mC*CGUCCGUGGGGGAUGAGGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	chr6:29943062-29943082
G019002	2020	UCAUCCCCCACGGACGGGCC	UCAUCCCCCACGGACGGGCCGUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGU	mU*mC*mA*UCCCCCACGGACGGGCCGUUUUAGAmGmCmUmAm	chr6:29943063-29943083

			UAAAAUAAGGC UAGUCCGUUAU CAACUUGAAAA AGUGGCACCGA GUCGGUGCUUU U	GmAmAmAmUm AmGmCAAGUU AAAAUAAGGCU AGUCCGUUAUC AmAmCmUmUm GmAmAmAmAm AmGmUmGmGm CmAmCmCmGm AmGmUmCmGm GmUmGmCmU*m U*mU*mU	
G019003	2021	AUCUCGGA CCCGGAGA CUGU	AUCUCGGACCC GGAGACUGUGU UUUAGAGCUAG AAAUAGCAAGU UAAAAUAAGGC UAGUCCGUUAU CAACUUGAAAA AGUGGCACCGA GUCGGUGCUUU U	mA*mU*mC*UC GGACCCGGAGA CUGUGUUUUAG AmGmCmUmAm GmAmAmAmUm AmGmCAAGUU AAAAUAAGGCU AGUCCGUUAUC AmAmCmUmUm GmAmAmAmAm AmGmUmGmGm CmAmCmCmGm AmGmUmCmGm GmUmGmCmU*m U*mU*mU	chr6:2994309 2-29943112
G019004	2022	GGGGUCCC GCGGCUUC GGGG	GGGGUCCCGCG GCUUCGGGGGU UUUAGAGCUAG AAAUAGCAAGU UAAAAUAAGGC UAGUCCGUUAU CAACUUGAAAA AGUGGCACCGA GUCGGUGCUUU	mG*mG*mG*GU CCCGCGGCUUC GGGGGUUUUAG AmGmCmUmAm GmAmAmAmUm AmGmCAAGUU AAAAUAAGGCU AGUCCGUUAUC AmAmCmUmUm	chr6:2994311 5-29943135

			U	GmAmAmAmAm AmGmUmGmGm CmAmCmCmGm AmGmUmCmGm GmUmGmCmU*m U*mU*mU	
G019005	2023	CUCGGGGU CCCGCGGC UUCG	CUCGGGGUCCC GCGGCUUCGGU UUUAGAGCUAG AAAUAGCAAGU UAAAAUAAGGC UAGUCCGUUAU CAACUUGAAAA AGUGGCACCGA GUCGGUGCUUU U	mC*mU*mC*GG GGUCCCGCGGC UUCGGUUUUAG AmGmCmUmAm GmAmAmAmUm AmGmCAAGUU AAAAUAAGGCU AGUCCGUUAUC AmAmCmUmUm GmAmAmAmAm AmGmUmGmGm CmAmCmCmGm AmGmUmCmGm GmUmGmCmU*m U*mU*mU	chr6:2994311 8-29943138
G019006	2024	UCUCGGGG UCCCGCGG CUUC	UCUCGGGGUCC CGCGGCUUCGU UUUAGAGCUAG AAAUAGCAAGU UAAAAUAAGGC UAGUCCGUUAU CAACUUGAAAA AGUGGCACCGA GUCGGUGCUUU U	mU*mC*mU*CG GGGUCCCGCGG CUUCGUUUUAG AmGmCmUmAm GmAmAmAmUm AmGmCAAGUU AAAAUAAGGCU AGUCCGUUAUC AmAmCmUmUm GmAmAmAmAm AmGmUmGmGm CmAmCmCmGm AmGmUmCmGm GmUmGmCmU*m	chr6:2994311 9-29943139

				U*mU*mU	
G019007	2025	GUCUCGGGGUCCCGCGGCUU	GUCUCGGGGUCCCGCGGCUUGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU	mG*mU*mC*UCGGGGUCCCGCGGCUUGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	chr6:29943120-29943140
G019008	2026	GCAAGGGUCUCGGGGUCCCG	GCAAGGGUCUCGGGGUCCCGGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU	mG*mC*mA*AGGGUCUCGGGGUCCCGGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	chr6:29943126-29943146
G019009	2027	GGACCCCGAGACCCUUGCCC	GGACCCCGAGACCCUUGCCCGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGU	mG*mG*mA*CCCCGAGACCCUUGCCCGUUUUAGAmGmCmUmAm	chr6:29943128-29943148

			UAAAAUAAGGC UAGUCCGUUAU CAACUUGAAAA AGUGGCACCGA GUCGGUGCUUU U	GmAmAmAmUm AmGmCAAGUU AAAAUAAGGCU AGUCCGUUAUC AmAmCmUmUm GmAmAmAmAm AmGmUmGmGm CmAmCmCmGm AmGmUmCmGm GmUmGmCmU*m U*mU*mU	
G019010	2028	GACCCCGA GACCCUUG CCCC	GACCCCGAGAC CCUUGCCCCGU UUUAGAGCUAG AAAUAGCAAGU UAAAAUAAGGC UAGUCCGUUAU CAACUUGAAAA AGUGGCACCGA GUCGGUGCUUU U	mG*mA*mC*CCC GAGACCCUUGC CCCGUUUUAGA mGmCmUmAmG mAmAmAmUmA mGmCAAGUUA AAAUAAGGCUA GUCCGUUAUCA mAmCmUmUmG mAmAmAmAmA mGmUmGmGmC mAmCmCmGmA mGmUmCmGmG mUmGmCmU*mU *mU*mU	chr6:2994312 9-29943149
G019011	2029	CGAGACCC UUGCCCCG GGAG	CGAGACCCUUG CCCCGGGAGGU UUUAGAGCUAG AAAUAGCAAGU UAAAAUAAGGC UAGUCCGUUAU CAACUUGAAAA AGUGGCACCGA GUCGGUGCUUU	mC*mG*mA*GA CCCUUGCCCCG GGAGGUUUUAG AmGmCmUmAm GmAmAmAmUm AmGmCAAGUU AAAAUAAGGCU AGUCCGUUAUC AmAmCmUmUm	chr6:2994313 4-29943154

			U	GmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	
G019012	2030	CUCCCGGGGCAAGGGUCUCG	CUCCCGGGGCAAGGGUCUCGGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU	mC*mU*mC*CCGGGGCAAGGGUCUCGGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	chr6:29943134-29943154
G019013	2031	UCUCCCGGGGCAAGGGUCUC	UCUCCCGGGGCAAGGGUCUCGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU	mU*mC*mU*CCCGGGGCAAGGGUCUCGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU	chr6:29943135-29943155

				*mU*mU	
G019014	2032	CUCUCCCG GGGCAAGG GUCU	CUCUCCCGGGG CAAGGGUCUGU UUUAGAGCUAG AAAUAGCAAGU UAAAAUAAGGC UAGUCCGUUAU CAACUUGAAAA AGUGGCACCGA GUCGGUGCUUU U	mC*mU*mC*UCC CGGGGCAAGGG UCUGUUUUAGA mGmCmUmAmG mAmAmAmUmA mGmCAAGUUA AAAUAAGGCUA GUCCGUUAUCA mAmCmUmUmG mAmAmAmAmA mGmUmGmGmC mAmCmCmGmA mGmUmCmGmG mUmGmCmU*mU *mU*mU	chr6:2994313 6-29943156
G019015	2033	CCUUGCCCC GGGAGAGG CCC	CCUUGCCCCGG GAGAGGCCCGU UUUAGAGCUAG AAAUAGCAAGU UAAAAUAAGGC UAGUCCGUUAU CAACUUGAAAA AGUGGCACCGA GUCGGUGCUUU U	mC*mC*mU*UG CCCCGGGAGAG GCCCGUUUUAG AmGmCmUmAm GmAmAmAmUm AmGmCAAGUU AAAAUAAGGCU AGUCCGUUAUC AmAmCmUmUm GmAmAmAmAm AmGmUmGmGm CmAmCmCmGm AmGmUmCmGm GmUmGmCmU*m U*mU*mU	chr6:2994314 0-29943160
G019016	2034	CUGGGCCU CUCCCGGG GCAA	CUGGGCCUCUC CCGGGGCAAGU UUUAGAGCUAG AAAUAGCAAGU	mC*mU*mG*GG CCUCUCCCGGG GCAAGUUUUAG AmGmCmUmAm	chr6:2994314 2-29943162

			UAAAAUAAGGC UAGUCCGUUAU CAACUUGAAAA AGUGGCACCGA GUCGGUGCUUU U	GmAmAmAmUm AmGmCAAGUU AAAAUAAGGCU AGUCCGUUAUC AmAmCmUmUm GmAmAmAmAm AmGmUmGmGm CmAmCmCmGm AmGmUmCmGm GmUmGmCmU*m U*mU*mU	
G019017	2035	CCUGGGCC UCUCCCGG GGCA	CCUGGGCCUCU CCCGGGGCAGU UUUAGAGCUAG AAAUAGCAAGU UAAAAUAAGGC UAGUCCGUUAU CAACUUGAAAA AGUGGCACCGA GUCGGUGCUUU U	mC*mC*mU*GG GCCUCUCCCGG GGCAGUUUUAG AmGmCmUmAm GmAmAmAmUm AmGmCAAGUU AAAAUAAGGCU AGUCCGUUAUC AmAmCmUmUm GmAmAmAmAm AmGmUmGmGm CmAmCmCmGm AmGmUmCmGm GmUmGmCmU*m U*mU*mU	chr6:2994314 3-29943163
G019019	2036	UUUAGGCC AAAAAUCC CCCC	UUUAGGCCAAA AAUCCCCCCGU UUUAGAGCUAG AAAUAGCAAGU UAAAAUAAGGC UAGUCCGUUAU CAACUUGAAAA AGUGGCACCGA GUCGGUGCUUU	mU*mU*mU*AG GCCAAAAAUCC CCCCGUUUUAG AmGmCmUmAm GmAmAmAmUm AmGmCAAGUU AAAAUAAGGCU AGUCCGUUAUC AmAmCmUmUm	chr6:2994318 8-29943208

			U	GmAmAmAmAm AmGmUmGmGm CmAmCmCmGm AmGmUmCmGm GmUmGmCmU*m U*mU*mU	
G021208	2037	CGCUGCAG CGCACGGG UACC	CGCUGCAGCGC ACGGGUACCGU UUUAGAGCUAG AAAUAGCAAGU UAAAAUAAGGC UAGUCCGUUAU CAACUUGAAAA AGUGGCACCGA GUCGGUGCUUU U	mC*mG*mC*UG CAGCGCACGGG UACCGUUUUAG AmGmCmUmAm GmAmAmAmUm AmGmCAAGUU AAAAUAAGGCU AGUCCGUUAUC AmAmCmUmUm GmAmAmAmAm AmGmUmGmGm CmAmCmCmGm AmGmUmCmGm GmUmGmCmU*m U*mU*mU	chr6:2994352 8-29943548
G021209	2038	GCUGCAGC GCACGGGU ACCA	GCUGCAGCGCA CGGGUACCAGU UUUAGAGCUAG AAAUAGCAAGU UAAAAUAAGGC UAGUCCGUUAU CAACUUGAAAA AGUGGCACCGA GUCGGUGCUUU U	mG*mC*mU*GC AGCGCACGGGU ACCAGUUUUAG AmGmCmUmAm GmAmAmAmUm AmGmCAAGUU AAAAUAAGGCU AGUCCGUUAUC AmAmCmUmUm GmAmAmAmAm AmGmUmGmGm CmAmCmCmGm AmGmUmCmGm GmUmGmCmU*m	chr6:2994352 9-29943549

				U*mU*mU	
G021210	2039	CUGCAGCG CACGGGUA CCAG	CUGCAGCGCAC GGGUACCAGGU UUUAGAGCUAG AAAUAGCAAGU UAAAAUAAGGC UAGUCCGUUAU CAACUUGAAAA AGUGGCACCGA GUCGGUGCUUU U	mC*mU*mG*CA GCGCACGGGUA CCAGGUUUUAG AmGmCmUmAm GmAmAmAmUm AmGmCAAGUU AAAAUAAGGCU AGUCCGUUAUC AmAmCmUmUm GmAmAmAmAm AmGmUmGmGm CmAmCmCmGm AmGmUmCmGm GmUmGmCmU*m U*mU*mU	chr6:2994353 0-29943550
G018932	2040	CGCACGGG UACCAGGG GCCA	CGCACGGGUAC CAGGGGCCAGU UUUAGAGCUAG AAAUAGCAAGU UAAAAUAAGGC UAGUCCGUUAU CAACUUGAAAA AGUGGCACCGA GUCGGUGCUUU U	mC*mG*mC*AC GGGUACCAGGG GCCAGUUUUAG AmGmCmUmAm GmAmAmAmUm AmGmCAAGUU AAAAUAAGGCU AGUCCGUUAUC AmAmCmUmUm GmAmAmAmAm AmGmUmGmGm CmAmCmCmGm AmGmUmCmGm GmUmGmCmU*m U*mU*mU	chr6:2994353 6-29943556
G018933	2041	GCACGGGU ACCAGGGG CCAC	GCACGGGUACC AGGGGCCACGU UUUAGAGCUAG AAAUAGCAAGU	mG*mC*mA*CG GGUACCAGGGG CCACGUUUUAG AmGmCmUmAm	chr6:2994353 7-29943557

			UAAAAUAAGGC UAGUCCGUUAU CAACUUGAAAA AGUGGCACCGA GUCGGUGCUUU U	GmAmAmAmUm AmGmCAAGUU AAAAUAAGGCU AGUCCGUUAUC AmAmCmUmUm GmAmAmAmAm AmGmUmGmGm CmAmCmCmGm AmGmUmCmGm GmUmGmCmU*m U*mU*mU	
G018934	2042	CACGGGUA CCAGGGGC CACG	CACGGGUACCA GGGGCCACGGU UUUAGAGCUAG AAAUAGCAAGU UAAAAUAAGGC UAGUCCGUUAU CAACUUGAAAA AGUGGCACCGA GUCGGUGCUUU U	mC*mA*mC*GG GUACCAGGGGC CACGGUUUUAG AmGmCmUmAm GmAmAmAmUm AmGmCAAGUU AAAAUAAGGCU AGUCCGUUAUC AmAmCmUmUm GmAmAmAmAm AmGmUmGmGm CmAmCmCmGm AmGmUmCmGm GmUmGmCmU*m U*mU*mU	chr6:2994353 8-29943558
G018935	2043	GGGAGGCG CCCCGUGG CCCC	GGGAGGCGCCC CGUGGCCCCGU UUUAGAGCUAG AAAUAGCAAGU UAAAAUAAGGC UAGUCCGUUAU CAACUUGAAAA AGUGGCACCGA GUCGGUGCUUU	mG*mG*mG*AG GCGCCCCGUGG CCCCGUUUUAG AmGmCmUmAm GmAmAmAmUm AmGmCAAGUU AAAAUAAGGCU AGUCCGUUAUC AmAmCmUmUm	chr6:2994354 9-29943569

			U	GmAmAmAmAm AmGmUmGmGm CmAmCmCmGm AmGmUmCmGm GmUmGmCmU*m U*mU*mU	
G018936	2044	GCGAUCAG GGAGGCGC CCCG	GCGAUCAGGGA GGCGCCCCGGU UUUAGAGCUAG AAAUAGCAAGU UAAAAUAAGGC UAGUCCGUUAU CAACUUGAAAA AGUGGCACCGA GUCGGUGCUUU U	mG*mC*mG*AU CAGGGAGGCGC CCCGGUUUUAG AmGmCmUmAm GmAmAmAmUm AmGmCAAGUU AAAAUAAGGCU AGUCCGUUAUC AmAmCmUmUm GmAmAmAmAm AmGmUmGmGm CmAmCmCmGm AmGmUmCmGm GmUmGmCmU*m U*mU*mU	chr6:2994355 6-29943576
G021211	2045	UCCUUGUG GGAGGCCA GCCC	UCCUUGUGGGA GGCCAGCCCGU UUUAGAGCUAG AAAUAGCAAGU UAAAAUAAGGC UAGUCCGUUAU CAACUUGAAAA AGUGGCACCGA GUCGGUGCUUU U	mU*mC*mC*UU GUGGGAGGCCA GCCCGUUUUAG AmGmCmUmAm GmAmAmAmUm AmGmCAAGUU AAAAUAAGGCU AGUCCGUUAUC AmAmCmUmUm GmAmAmAmAm AmGmUmGmGm CmAmCmCmGm AmGmUmCmGm GmUmGmCmU*m	chr6:2994358 9-29943609

				U*mU*mU	
G018938	2046	CUCCUUGUGGGAGGCCAGCC	CUCCUUGUGGGAGGCCAGCCGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU	mC*mU*mC*CUUGUGGGAGGCCAGCCGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	chr6:29943590-29943610
G018939	2047	GGCUGGCCUCCCACAAGGAG	GGCUGGCCUCCCACAAGGAGGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU	mG*mG*mC*UGGCCUCCCACAAGGAGGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	chr6:29943590-29943610
G018940	2048	UUGUCUCCCCUCCUUGUGGG	UUGUCUCCCCUCCUUGUGGGGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGU	mU*mU*mG*UCUCCCCUCCUUGUGGGGUUUUAGAmGmCmUmAm	chr6:29943599-29943619

			UAAAAUAAGGC UAGUCCGUUAU CAACUUGAAAA AGUGGCACCGA GUCGGUGCUUU U	GmAmAmAmUm AmGmCAAGUU AAAAUAAGGCU AGUCCGUUAUC AmAmCmUmUm GmAmAmAmAm AmGmUmGmGm CmAmCmCmGm AmGmUmCmGm GmUmGmCmU*m U*mU*mU	
G018941	2049	CCACAAGG AGGGGAGA CAAU	CCACAAGGAGG GGAGACAAUGU UUUAGAGCUAG AAAUAGCAAGU UAAAAUAAGGC UAGUCCGUUAU CAACUUGAAAA AGUGGCACCGA GUCGGUGCUUU U	mC*mC*mA*CA AGGAGGGGAGA CAAUGUUUUAG AmGmCmUmAm GmAmAmAmUm AmGmCAAGUU AAAAUAAGGCU AGUCCGUUAUC AmAmCmUmUm GmAmAmAmAm AmGmUmGmGm CmAmCmCmGm AmGmUmCmGm GmUmGmCmU*m U*mU*mU	chr6:2994360 0-29943620
G018942	2050	CACAAGGA GGGGAGAC AAUU	CACAAGGAGGG GAGACAAUUGU UUUAGAGCUAG AAAUAGCAAGU UAAAAUAAGGC UAGUCCGUUAU CAACUUGAAAA AGUGGCACCGA GUCGGUGCUUU	mC*mA*mC*AA GGAGGGGAGAC AAUUGUUUUAG AmGmCmUmAm GmAmAmAmUm AmGmCAAGUU AAAAUAAGGCU AGUCCGUUAUC AmAmCmUmUm	chr6:2994360 1-29943621

			U	GmAmAmAmAm AmGmUmGmGm CmAmCmCmGm AmGmUmCmGm GmUmGmCmU*m U*mU*mU	
G018943	2051	CAAUUGUC UCCCCUCCU UGU	CAAUUGUCUCC CCUCCUUGUGU UUUAGAGCUAG AAAUAGCAAGU UAAAAUAAGGC UAGUCCGUUAU CAACUUGAAAA AGUGGCACCGA GUCGGUGCUUU U	mC*mA*mA*UU GUCUCCCCUCC UUGUGUUUUAG AmGmCmUmAm GmAmAmAmUm AmGmCAAGUU AAAAUAAGGCU AGUCCGUUAUC AmAmCmUmUm GmAmAmAmAm AmGmUmGmGm CmAmCmCmGm AmGmUmCmGm GmUmGmCmU*m U*mU*mU	chr6:2994360 2-29943622
G018944	2052	CCAAUUGU CUCCCCUCC UUG	CCAAUUGUCUC CCCUCCUUGGU UUUAGAGCUAG AAAUAGCAAGU UAAAAUAAGGC UAGUCCGUUAU CAACUUGAAAA AGUGGCACCGA GUCGGUGCUUU U	mC*mC*mA*AU UGUCUCCCCUC CUUGGUUUUAG AmGmCmUmAm GmAmAmAmUm AmGmCAAGUU AAAAUAAGGCU AGUCCGUUAUC AmAmCmUmUm GmAmAmAmAm AmGmUmGmGm CmAmCmCmGm AmGmUmCmGm GmUmGmCmU*m	chr6:2994360 3-29943623

				U*mU*mU	
G018945	2053	AUCCCUCG AAUACUGA UGAG	AUCCCUCGAAU ACUGAUGAGGU UUUAGAGCUAG AAAUAGCAAGU UAAAAUAAGGC UAGUCCGUUAU CAACUUGAAAA AGUGGCACCGA GUCGGUGCUUU U	mA*mU*mC*CC UCGAAUACUGA UGAGGUUUUAG AmGmCmUmAm GmAmAmAmUm AmGmCAAGUU AAAAUAAGGCU AGUCCGUUAUC AmAmCmUmUm GmAmAmAmAm AmGmUmGmGm CmAmCmCmGm AmGmUmCmGm GmUmGmCmU*m U*mU*mU	chr6:2994377 4-29943794
G018946	2054	AACCACUC AUCAGUAU UCGA	AACCACUCAUC AGUAUUCGAGU UUUAGAGCUAG AAAUAGCAAGU UAAAAUAAGGC UAGUCCGUUAU CAACUUGAAAA AGUGGCACCGA GUCGGUGCUUU U	mA*mA*mC*CA CUCAUCAGUAU UCGAGUUUUAG AmGmCmUmAm GmAmAmAmUm AmGmCAAGUU AAAAUAAGGCU AGUCCGUUAUC AmAmCmUmUm GmAmAmAmAm AmGmUmGmGm CmAmCmCmGm AmGmUmCmGm GmUmGmCmU*m U*mU*mU	chr6:2994377 9-29943799
G018947	2055	GAACCACU CAUCAGUA UUCG	GAACCACUCAU CAGUAUUCGGU UUUAGAGCUAG AAAUAGCAAGU	mG*mA*mA*CC ACUCAUCAGUA UUCGGUUUUAG AmGmCmUmAm	chr6:2994378 0-29943800

			UAAAAUAAGGC UAGUCCGUUAU CAACUUGAAAA AGUGGCACCGA GUCGGUGCUUU U	GmAmAmAmUm AmGmCAAGUU AAAAUAAGGCU AGUCCGUUAUC AmAmCmUmUm GmAmAmAmAm AmGmUmGmGm CmAmCmCmGm AmGmUmCmGm GmUmGmCmU*m U*mU*mU	
G018948	2056	GAGGAAAA GUCACGGG CCCA	GAGGAAAAGUC ACGGGCCCAGU UUUAGAGCUAG AAAUAGCAAGU UAAAAUAAGGC UAGUCCGUUAU CAACUUGAAAA AGUGGCACCGA GUCGGUGCUUU U	mG*mA*mG*GA AAAGUCACGGG CCCAGUUUUAG AmGmCmUmAm GmAmAmAmUm AmGmCAAGUU AAAAUAAGGCU AGUCCGUUAUC AmAmCmUmUm GmAmAmAmAm AmGmUmGmGm CmAmCmCmGm AmGmUmCmGm GmUmGmCmU*m U*mU*mU	chr6:2994382 2-29943842
G018949	2057	GGCCCGUG ACUUUUCC UCUC	GGCCCGUGACU UUUCCUCUCGU UUUAGAGCUAG AAAUAGCAAGU UAAAAUAAGGC UAGUCCGUUAU CAACUUGAAAA AGUGGCACCGA GUCGGUGCUUU	mG*mG*mC*CC GUGACUUUUCC UCUCGUUUUAG AmGmCmUmAm GmAmAmAmUm AmGmCAAGUU AAAAUAAGGCU AGUCCGUUAUC AmAmCmUmUm	chr6:2994382 4-29943844

			U	GmAmAmAmAm AmGmUmGmGm CmAmCmCmGm AmGmUmCmGm GmUmGmCmU*m U*mU*mU	
G018950	2058	UGCUUCAC ACUCAAUG UGUG	UGCUUCACACU CAAUGUGUGGU UUUAGAGCUAG AAAUAGCAAGU UAAAAUAAGGC UAGUCCGUUAU CAACUUGAAAA AGUGGCACCGA GUCGGUGCUUU U	mU*mG*mC*UU CACACUCAAUG UGUGGUUUUAG AmGmCmUmAm GmAmAmAmUm AmGmCAAGUU AAAAUAAGGCU AGUCCGUUAUC AmAmCmUmUm GmAmAmAmAm AmGmUmGmGm CmAmCmCmGm AmGmUmCmGm GmUmGmCmU*m U*mU*mU	chr6:2994385 7-29943877
G018951	2059	GCUUCACA CUCAAUGU GUGU	GCUUCACACUC AAUGUGUGUGU UUUAGAGCUAG AAAUAGCAAGU UAAAAUAAGGC UAGUCCGUUAU CAACUUGAAAA AGUGGCACCGA GUCGGUGCUUU U	mG*mC*mU*UC ACACUCAAUGU GUGUGUUUUAG AmGmCmUmAm GmAmAmAmUm AmGmCAAGUU AAAAUAAGGCU AGUCCGUUAUC AmAmCmUmUm GmAmAmAmAm AmGmUmGmGm CmAmCmCmGm AmGmUmCmGm GmUmGmCmU*m	chr6:2994385 8-29943878

				U*mU*mU	
G018952	2060	CUUCACAC UCAAUGUG UGUG	CUUCACACUCA AUGUGUGUGGU UUUAGAGCUAG AAAUAGCAAGU UAAAAUAAGGC UAGUCCGUUAU CAACUUGAAAA AGUGGCACCGA GUCGGUGCUUU U	mC*mU*mU*CA CACUCAAUGUG UGUGGUUUUAG AmGmCmUmAm GmAmAmAmUm AmGmCAAGUU AAAAUAAGGCU AGUCCGUUAUC AmAmCmUmUm GmAmAmAmAm AmGmUmGmGm CmAmCmCmGm AmGmUmCmGm GmUmGmCmU*m U*mU*mU	chr6:2994385 9-29943879
G018953	2061	UUCACACU CAAUGUGU GUGG	UUCACACUCAA UGUGUGUGGGU UUUAGAGCUAG AAAUAGCAAGU UAAAAUAAGGC UAGUCCGUUAU CAACUUGAAAA AGUGGCACCGA GUCGGUGCUUU U	mU*mU*mC*AC ACUCAAUGUGU GUGGGUUUUAG AmGmCmUmAm GmAmAmAmUm AmGmCAAGUU AAAAUAAGGCU AGUCCGUUAUC AmAmCmUmUm GmAmAmAmAm AmGmUmGmGm CmAmCmCmGm AmGmUmCmGm GmUmGmCmU*m U*mU*mU	chr6:2994386 0-29943880
G018954	2062	UUGAGAAU GGACAGGA CACC	UUGAGAAUGGA CAGGACACCGU UUUAGAGCUAG AAAUAGCAAGU	mU*mU*mG*AG AAUGGACAGGA CACCGUUUUAG AmGmCmUmAm	chr6:2994402 6-29944046

			UAAAAUAAGGC UAGUCCGUUAU CAACUUGAAAA AGUGGCACCGA GUCGGUGCUUU U	GmAmAmAmUm AmGmCAAGUU AAAAUAAGGCU AGUCCGUUAUC AmAmCmUmUm GmAmAmAmAm AmGmUmGmGm CmAmCmCmGm AmGmUmCmGm GmUmGmCmU*m U*mU*mU	
G021205	2063	AGGCAUUU UGCAUCUG UCAU	AGGCAUUUUGC AUCUGUCAUGU UUUAGAGCUAG AAAUAGCAAGU UAAAAUAAGGC UAGUCCGUUAU CAACUUGAAAA AGUGGCACCGA GUCGGUGCUUU U	mA*mG*mG*CA UUUUGCAUCUG UCAUGUUUUAG AmGmCmUmAm GmAmAmAmUm AmGmCAAGUU AAAAUAAGGCU AGUCCGUUAUC AmAmCmUmUm GmAmAmAmAm AmGmUmGmGm CmAmCmCmGm AmGmUmCmGm GmUmGmCmU*m U*mU*mU	chr6:2994407 7-29944097
G021206	2064	CAGGCAUU UUGCAUCU GUCA	CAGGCAUUUUG CAUCUGUCAGU UUUAGAGCUAG AAAUAGCAAGU UAAAAUAAGGC UAGUCCGUUAU CAACUUGAAAA AGUGGCACCGA GUCGGUGCUUU	mC*mA*mG*GC AUUUUGCAUCU GUCAGUUUUAG AmGmCmUmAm GmAmAmAmUm AmGmCAAGUU AAAAUAAGGCU AGUCCGUUAUC AmAmCmUmUm	chr6:2994407 8-29944098

			U	GmAmAmAmAm AmGmUmGmGm CmAmCmCmGm AmGmUmCmGm GmUmGmCmU*m U*mU*mU	
G018955	2065	AGGGGCCC UGACCCUG CUAA	AGGGGCCCUGA CCCUGCUAAGU UUUAGAGCUAG AAAUAGCAAGU UAAAAUAAGGC UAGUCCGUUAU CAACUUGAAAA AGUGGCACCGA GUCGGUGCUUU U	mA*mG*mG*GG CCCUGACCCUG CUAAGUUUUAG AmGmCmUmAm GmAmAmAmUm AmGmCAAGUU AAAAUAAGGCU AGUCCGUUAUC AmAmCmUmUm GmAmAmAmAm AmGmUmGmGm CmAmCmCmGm AmGmUmCmGm GmUmGmCmU*m U*mU*mU	chr6:2994445 8-29944478
G018956	2066	UGGGAAAA GAGGGGAA GGUG	UGGGAAAAGAG GGGAAGGUGGU UUUAGAGCUAG AAAUAGCAAGU UAAAAUAAGGC UAGUCCGUUAU CAACUUGAAAA AGUGGCACCGA GUCGGUGCUUU U	mU*mG*mG*GA AAAGAGGGGAA GGUGGUUUUAG AmGmCmUmAm GmAmAmAmUm AmGmCAAGUU AAAAUAAGGCU AGUCCGUUAUC AmAmCmUmUm GmAmAmAmAm AmGmUmGmGm CmAmCmCmGm AmGmUmCmGm GmUmGmCmU*m	chr6:2994447 8-29944498

				U*mU*mU	
G018957	2067	UGGAGGAG GAAGAGCU CAGG	UGGAGGAGGAA GAGCUCAGGGU UUUAGAGCUAG AAAUAGCAAGU UAAAAUAAGGC UAGUCCGUUAU CAACUUGAAAA AGUGGCACCGA GUCGGUGCUUU U	mU*mG*mG*AG GAGGAAGAGCU CAGGGUUUUAG AmGmCmUmAm GmAmAmAmUm AmGmCAAGUU AAAAUAAGGCU AGUCCGUUAUC AmAmCmUmUm GmAmAmAmAm AmGmUmGmGm CmAmCmCmGm AmGmUmCmGm GmUmGmCmU*m U*mU*mU	chr6:2994459 7-29944617
G018958	2068	UGAGAUUU CUUGUCUC ACUG	UGAGAUUUCUU GUCUCACUGGU UUUAGAGCUAG AAAUAGCAAGU UAAAAUAAGGC UAGUCCGUUAU CAACUUGAAAA AGUGGCACCGA GUCGGUGCUUU U	mU*mG*mA*GA UUUCUUGUCUC ACUGGUUUUAG AmGmCmUmAm GmAmAmAmUm AmGmCAAGUU AAAAUAAGGCU AGUCCGUUAUC AmAmCmUmUm GmAmAmAmAm AmGmUmGmGm CmAmCmCmGm AmGmUmCmGm GmUmGmCmU*m U*mU*mU	chr6:2994464 2-29944662
G018959	2069	GAGAUUUC UUGUCUCA CUGA	GAGAUUUCUUG UCUCACUGAGU UUUAGAGCUAG AAAUAGCAAGU	mG*mA*mG*AU UUCUUGUCUCA CUGAGUUUUAG AmGmCmUmAm	chr6:2994464 3-29944663

			UAAAAUAAGGC UAGUCCGUUAU CAACUUGAAAA AGUGGCACCGA GUCGGUGCUUU U	GmAmAmAmUm AmGmCAAGUU AAAAUAAGGCU AGUCCGUUAUC AmAmCmUmUm GmAmAmAmAm AmGmUmGmGm CmAmCmCmGm AmGmUmCmGm GmUmGmCmU*m U*mU*mU	
G018960	2070	UAAAGCAC CUGUUAAA AUGA	UAAAGCACCUG UUAAAAUGAGU UUUAGAGCUAG AAAUAGCAAGU UAAAAUAAGGC UAGUCCGUUAU CAACUUGAAAA AGUGGCACCGA GUCGGUGCUUU U	mU*mA*mA*AG CACCUGUUAAA AUGAGUUUUAG AmGmCmUmAm GmAmAmAmUm AmGmCAAGUU AAAAUAAGGCU AGUCCGUUAUC AmAmCmUmUm GmAmAmAmAm AmGmUmGmGm CmAmCmCmGm AmGmUmCmGm GmUmGmCmU*m U*mU*mU	chr6:2994477 2-29944792
G018961	2071	AAUCUGUC CUUCAUUU UAAC	AAUCUGUCCUU CAUUUUAACGU UUUAGAGCUAG AAAUAGCAAGU UAAAAUAAGGC UAGUCCGUUAU CAACUUGAAAA AGUGGCACCGA GUCGGUGCUUU	mA*mA*mU*CU GUCCUUCAUUU UAACGUUUUAG AmGmCmUmAm GmAmAmAmUm AmGmCAAGUU AAAAUAAGGCU AGUCCGUUAUC AmAmCmUmUm	chr6:2994478 2-29944802

			U	GmAmAmAmAm AmGmUmGmGm CmAmCmCmGm AmGmUmCmGm GmUmGmCmU*m U*mU*mU	
G018962	2072	GUCACAGG GGAAGGUC CCUG	GUCACAGGGGA AGGUCCCUGGU UUUAGAGCUAG AAAUAGCAAGU UAAAAUAAGGC UAGUCCGUUAU CAACUUGAAAA AGUGGCACCGA GUCGGUGCUUU U	mG*mU*mC*AC AGGGGAAGGUC CCUGGUUUUAG AmGmCmUmAm GmAmAmAmUm AmGmCAAGUU AAAAUAAGGCU AGUCCGUUAUC AmAmCmUmUm GmAmAmAmAm AmGmUmGmGm CmAmCmCmGm AmGmUmCmGm GmUmGmCmU*m U*mU*mU	chr6:2994485 0-29944870
G018964	2073	AAACAUGA AGAAAGCA GGUG	AAACAUGAAGA AAGCAGGUGGU UUUAGAGCUAG AAAUAGCAAGU UAAAAUAAGGC UAGUCCGUUAU CAACUUGAAAA AGUGGCACCGA GUCGGUGCUUU U	mA*mA*mA*CA UGAAGAAAGCA GGUGGUUUUAG AmGmCmUmAm GmAmAmAmUm AmGmCAAGUU AAAAUAAGGCU AGUCCGUUAUC AmAmCmUmUm GmAmAmAmAm AmGmUmGmGm CmAmCmCmGm AmGmUmCmGm GmUmGmCmU*m	chr6:2994490 7-29944927

				U*mU*mU	
G018966	2074	UGUCCUGUGAGAUACCAGAA	UGUCCUGUGAGAUACCAGAAGUUUUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU	mU*mG*mU*CCUGUGAGAUACCAGAAGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU	chr6:29945024-29945044
G018967	2075	AUGAAGGAGGCUGAUGCCUG	AUGAAGGAGGCUGAUGCCUGGUUUUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU	mA*mU*mG*AAGGAGGCUGAUGCCUGGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU	chr6:29945097-29945117
G018968	2076	AGGCUGAUGCCUGAGGUCCU	AGGCUGAUGCCUGAGGUCCUGUUUAGAAAUAGCAAGU	mA*mG*mG*CUGAUGCCUGAGGUCCUGUUUUAGAmGmCmUmAm	chr6:29945104-29945124

			UAAAAUAAGGC UAGUCCGUUAU CAACUUGAAAA AGUGGCACCGA GUCGGUGCUUU U	GmAmAmAmUm AmGmCAAGUU AAAAUAAGGCU AGUCCGUUAUC AmAmCmUmUm GmAmAmAmAm AmGmUmGmGm CmAmCmCmGm AmGmUmCmGm GmUmGmCmU*m U*mU*mU	
G018969	2077	GGCUGAUG CCUGAGGU CCUU	GGCUGAUGCCU GAGGUCCUUGU UUUAGAGCUAG AAAUAGCAAGU UAAAAUAAGGC UAGUCCGUUAU CAACUUGAAAA AGUGGCACCGA GUCGGUGCUUU U	mG*mG*mC*UG AUGCCUGAGGU CCUUGUUUUAG AmGmCmUmAm GmAmAmAmUm AmGmCAAGUU AAAAUAAGGCU AGUCCGUUAUC AmAmCmUmUm GmAmAmAmAm AmGmUmGmGm CmAmCmCmGm AmGmUmCmGm GmUmGmCmU*m U*mU*mU	chr6:2994510 5-29945125
G018970	2078	CACAAUAU CCCAAGGA CCUC	CACAAUAUCCC AAGGACCUCGU UUUAGAGCUAG AAAUAGCAAGU UAAAAUAAGGC UAGUCCGUUAU CAACUUGAAAA AGUGGCACCGA GUCGGUGCUUU	mC*mA*mC*AA UAUCCCAAGGA CCUCGUUUUAG AmGmCmUmAm GmAmAmAmUm AmGmCAAGUU AAAAUAAGGCU AGUCCGUUAUC AmAmCmUmUm	chr6:2994511 6-29945136

			U	GmAmAmAmAm AmGmUmGmGm CmAmCmCmGm AmGmUmCmGm GmUmGmCmU*m U*mU*mU	
G018971	2079	GGUCCUUG GGAUAUUG UGUU	GGUCCUUGGGA UAUUGUGUUGU UUUAGAGCUAG AAAUAGCAAGU UAAAAUAAGGC UAGUCCGUUAU CAACUUGAAAA AGUGGCACCGA GUCGGUGCUUU U	mG*mG*mU*CC UUGGGAUAUUG UGUUGUUUUAG AmGmCmUmAm GmAmAmAmUm AmGmCAAGUU AAAAUAAGGCU AGUCCGUUAUC AmAmCmUmUm GmAmAmAmAm AmGmUmGmGm CmAmCmCmGm AmGmUmCmGm GmUmGmCmU*m U*mU*mU	chr6:2994511 8-29945138
G018972	2080	GUCCUUGG GAUAUUGU GUUU	GUCCUUGGGAU AUUGUGUUUGU UUUAGAGCUAG AAAUAGCAAGU UAAAAUAAGGC UAGUCCGUUAU CAACUUGAAAA AGUGGCACCGA GUCGGUGCUUU U	mG*mU*mC*CU UGGGAUAUUGU GUUUGUUUUAG AmGmCmUmAm GmAmAmAmUm AmGmCAAGUU AAAAUAAGGCU AGUCCGUUAUC AmAmCmUmUm GmAmAmAmAm AmGmUmGmGm CmAmCmCmGm AmGmUmCmGm GmUmGmCmU*m	chr6:2994511 9-29945139

				U*mU*mU	
G018973	2081	CUCCCAAA CACAAUAU CCCA	CUCCCAAACAC AAUAUCCCAGU UUUAGAGCUAG AAAUAGCAAGU UAAAAUAAGGC UAGUCCGUUAU CAACUUGAAAA AGUGGCACCGA GUCGGUGCUUU U	mC*mU*mC*CCA AACACAAUAUC CCAGUUUUAGA mGmCmUmAmG mAmAmAmUmA mGmCAAGUUA AAAUAAGGCUA GUCCGUUAUCA mAmCmUmUmG mAmAmAmAmA mGmUmGmGmC mAmCmCmGmA mGmUmCmGmG mUmGmCmU*mU *mU*mU	chr6:2994512 4-29945144
G018974	2082	UCCUCUAG CCACAUCU UCUG	UCCUCUAGCCA CAUCUUCUGGU UUUAGAGCUAG AAAUAGCAAGU UAAAAUAAGGC UAGUCCGUUAU CAACUUGAAAA AGUGGCACCGA GUCGGUGCUUU U	mU*mC*mC*UC UAGCCACAUCU UCUGGUUUUAG AmGmCmUmAm GmAmAmAmUm AmGmCAAGUU AAAAUAAGGCU AGUCCGUUAUC AmAmCmUmUm GmAmAmAmAm AmGmUmGmGm CmAmCmCmGm AmGmUmCmGm GmUmGmCmU*m U*mU*mU	chr6:2994517 6-29945196
G018975	2083	ACAGAAGA UGUGGCUA GAGG	ACAGAAGAUGU GGCUAGAGGGU UUUAGAGCUAG AAAUAGCAAGU	mA*mC*mA*GA AGAUGUGGCUA GAGGGUUUUAG AmGmCmUmAm	chr6:2994517 7-29945197

			UAAAAUAAGGC UAGUCCGUUAU CAACUUGAAAA AGUGGCACCGA GUCGGUGCUUU U	GmAmAmAmUm AmGmCAAGUU AAAAUAAGGCU AGUCCGUUAUC AmAmCmUmUm GmAmAmAmAm AmGmUmGmGm CmAmCmCmGm AmGmUmCmGm GmUmGmCmU*m U*mU*mU	
G018976	2084	CCUCUAGC CACAUCUU CUGU	CCUCUAGCCAC AUCUUCUGUGU UUUAGAGCUAG AAAUAGCAAGU UAAAAUAAGGC UAGUCCGUUAU CAACUUGAAAA AGUGGCACCGA GUCGGUGCUUU U	mC*mC*mU*CU AGCCACAUCUU CUGUGUUUUAG AmGmCmUmAm GmAmAmAmUm AmGmCAAGUU AAAAUAAGGCU AGUCCGUUAUC AmAmCmUmUm GmAmAmAmAm AmGmUmGmGm CmAmCmCmGm AmGmUmCmGm GmUmGmCmU*m U*mU*mU	chr6:2994517 7-29945197
G018977	2085	CCCACAGA AGAUGUGG CUAG	CCCACAGAAGA UGUGGCUAGGU UUUAGAGCUAG AAAUAGCAAGU UAAAAUAAGGC UAGUCCGUUAU CAACUUGAAAA AGUGGCACCGA GUCGGUGCUUU	mC*mC*mC*ACA GAAGAUGUGGC UAGGUUUUAGA mGmCmUmAmG mAmAmAmUmA mGmCAAGUUA AAAUAAGGCUA GUCCGUUAUCA mAmCmUmUmG	chr6:2994518 0-29945200

			U	mAmAmAmAmA mGmUmGmGmC mAmCmCmGmA mGmUmCmGmG mUmGmCmU*mU *mU*mU	
G018978	2086	GUCAGAUC CCACAGAA GAUG	GUCAGAUCCCA CAGAAGAUGGU UUUAGAGCUAG AAAUAGCAAGU UAAAAUAAGGC UAGUCCGUUAU CAACUUGAAAA AGUGGCACCGA GUCGGUGCUUU U	mG*mU*mC*AG AUCCCACAGAA GAUGGUUUUAG AmGmCmUmAm GmAmAmAmUm AmGmCAAGUU AAAAUAAGGCU AGUCCGUUAUC AmAmCmUmUm GmAmAmAmAm AmGmUmGmGm CmAmCmCmGm AmGmUmCmGm GmUmGmCmU*m U*mU*mU	chr6:2994518 7-29945207
G018979	2087	AUCUUCUG UGGGAUCU GACC	AUCUUCUGUGG GAUCUGACCGU UUUAGAGCUAG AAAUAGCAAGU UAAAAUAAGGC UAGUCCGUUAU CAACUUGAAAA AGUGGCACCGA GUCGGUGCUUU U	mA*mU*mC*UU CUGUGGGAUCU GACCGUUUUAG AmGmCmUmAm GmAmAmAmUm AmGmCAAGUU AAAAUAAGGCU AGUCCGUUAUC AmAmCmUmUm GmAmAmAmAm AmGmUmGmGm CmAmCmCmGm AmGmUmCmGm GmUmGmCmU*m	chr6:2994518 8-29945208

				U*mU*mU	
G018980	2088	CCCAGGCAGUGACAGUGCCC	CCCAGGCAGUGACAGUGCCCGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU	mC*mC*mC*AGGCAGUGACAGUGCCCGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	chr6:29945228-29945248
G018981	2089	CUGGGCACUGUCACUGCCUG	CUGGGCACUGUCACUGCCUGGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU	mC*mU*mG*GGCACUGUCACUGCCUGGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	chr6:29945230-29945250
G018982	2090	CCUGGGCACUGUCACUGCCU	CCUGGGCACUGUCACUGCCUGUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGU	mC*mC*mU*GGGCACUGUCACUGCCUGUUUUAGAmGmCmUmAm	chr6:29945231-29945251

			UAAAAUAAGGC UAGUCCGUUAU CAACUUGAAAA AGUGGCACCGA GUCGGUGCUUU U	GmAmAmAmUm AmGmCAAGUU AAAAUAAGGCU AGUCCGUUAUC AmAmCmUmUm GmAmAmAmAm AmGmUmGmGm CmAmCmCmGm AmGmUmCmGm GmUmGmCmU*m U*mU*mU	
G021207	2091	CCCUGGGC ACUGUCAC UGCC	CCCUGGGCACU GUCACUGCCGU UUUAGAGCUAG AAAUAGCAAGU UAAAAUAAGGC UAGUCCGUUAU CAACUUGAAAA AGUGGCACCGA GUCGGUGCUUU U	mC*mC*mC*UG GGCACUGUCAC UGCCGUUUUAG AmGmCmUmAm GmAmAmAmUm AmGmCAAGUU AAAAUAAGGCU AGUCCGUUAUC AmAmCmUmUm GmAmAmAmAm AmGmUmGmGm CmAmCmCmGm AmGmUmCmGm GmUmGmCmU*m U*mU*mU	chr6:2994523 2-29945252
G018987	2092	UUGGGUGU UGGGCGGA ACAG	UUGGGUGUUGG GCGGAACAGGU UUUAGAGCUAG AAAUAGCAAGU UAAAAUAAGGC UAGUCCGUUAU CAACUUGAAAA AGUGGCACCGA GUCGGUGCUUU	mU*mU*mG*GG UGUUGGGCGGA ACAGGUUUUAG AmGmCmUmAm GmAmAmAmUm AmGmCAAGUU AAAAUAAGGCU AGUCCGUUAUC AmAmCmUmUm	chr6:2994530 8-29945328

			U	GmAmAmAmAm AmGmUmGmGm CmAmCmCmGm AmGmUmCmGm GmUmGmCmU*m U*mU*mU	
G018988	2093	UGGAUGUA UUGAGCAU GCGA	UGGAUGUAUUG AGCAUGCGAGU UUUAGAGCUAG AAAUAGCAAGU UAAAAUAAGGC UAGUCCGUUAU CAACUUGAAAA AGUGGCACCGA GUCGGUGCUUU U	mU*mG*mG*AU GUAUUGAGCAU GCGAGUUUUAG AmGmCmUmAm GmAmAmAmUm AmGmCAAGUU AAAAUAAGGCU AGUCCGUUAUC AmAmCmUmUm GmAmAmAmAm AmGmUmGmGm CmAmCmCmGm AmGmUmCmGm GmUmGmCmU*m U*mU*mU	chr6:2994536 1-29945381
G018989	2094	GGAUGUAU UGAGCAUG CGAU	GGAUGUAUUGA GCAUGCGAUGU UUUAGAGCUAG AAAUAGCAAGU UAAAAUAAGGC UAGUCCGUUAU CAACUUGAAAA AGUGGCACCGA GUCGGUGCUUU U	mG*mG*mA*UG UAUUGAGCAUG CGAUGUUUUAG AmGmCmUmAm GmAmAmAmUm AmGmCAAGUU AAAAUAAGGCU AGUCCGUUAUC AmAmCmUmUm GmAmAmAmAm AmGmUmGmGm CmAmCmCmGm AmGmUmCmGm GmUmGmCmU*m	chr6:2994536 2-29945382

				U*mU*mU	
G018963	2095	AACAUGAA GAAAGCAG GUGU	AACAUGAAGAA AGCAGGUGUGU UUUAGAGCUAG AAAUAGCAAGU UAAAAUAAGGC UAGUCCGUUAU CAACUUGAAAA AGUGGCACCGA GUCGGUGCUUU U	mA*mA*mC*AU GAAGAAAGCAG GUGUGUUUUAG AmGmCmUmAm GmAmAmAmUm AmGmCAAGUU AAAAUAAGGCU AGUCCGUUAUC AmAmCmUmUm GmAmAmAmAm AmGmUmGmGm CmAmCmCmGm AmGmUmCmGm GmUmGmCmU*m U*mU*mU	chr6:3138254 3-31382563

[00217] В некоторых вариантах осуществления эффективность HLA-A-направленной РНК определяют путем измерения уровней белка HLA-A на поверхности клетки. В некоторых вариантах осуществления уровни белка HLA-A измеряют с помощью проточной цитометрии (*например*, с антителом к HLA-A2 и/ или HLA-A3). В некоторых вариантах осуществления популяция клеток является по меньшей мере на 65% отрицательной по HLA-A, как измерено с помощью проточной цитометрии, относительно популяции немодифицированных клеток. В некоторых вариантах осуществления популяция клеток является по меньшей мере на 70% отрицательной по HLA-A, как измерено с помощью проточной цитометрии, относительно популяции немодифицированных клеток. В некоторых вариантах осуществления популяция клеток является по меньшей мере на 80% отрицательной по HLA-A, как измерено с помощью проточной цитометрии, относительно популяции немодифицированных клеток. В некоторых вариантах осуществления популяция клеток является по меньшей мере на 90% отрицательной по HLA-A, как измерено с помощью проточной цитометрии, относительно популяции немодифицированных клеток. В некоторых вариантах осуществления популяция клеток является по меньшей мере на 95% отрицательной по HLA-A, как измерено с помощью проточной цитометрии, относительно популяции немодифицированных клеток. В некоторых вариантах осуществления популяция клеток является по меньшей мере на 100% отрицательной по HLA-A, как измерено с помощью проточной цитометрии, относительно популяции немодифицированных клеток.

[00218] В некоторых вариантах осуществления эффективность B2M-направленной РНК или HLA-A-направленной можно определить путем измерения ответа иммунных

клеток in vitro или in vivo (*например*, CD8+ Т-клеток) на генетически модифицированную целевую клетку по сравнению с немодифицированной клеткой. Например, сниженный ответ CD8+ Т-клеток свидетельствует об эффективной B2M- или HLA-A-направленной РНК. Реакции CD8+ Т-клеток можно оценить с помощью анализа, который измеряет реакции активации CD8+ Т-клеток, *например*, пролиферацию CD8+ Т-клеток, экспрессию маркеров активации и/или продукцию цитокинов (IL-2, IFN-γ, TNF-α) (*например*, проточная цитометрия, ИФА). Реакцию CD8+ Т-клеток можно оценить in vitro или in vivo. В некоторых вариантах осуществления реакцию CD8+ Т-клеток можно оценить путем совместного культивирования генетически модифицированных клеток с CD8+ Т-клетками in vitro. В некоторых вариантах осуществления активность CD8+ Т-клеток можно оценить на модели in vivo, *например*, на модели грызунов. В модели in vivo,*например*, генетически модифицированные клетки можно вводить вместе с CD8+ Т-клеткой; выживаемость генетически модифицированных клеток свидетельствует о способности избежать лизиса CD8+ Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления способы позволяют получить композицию, содержащую клетку, которая выживает in vivo в присутствии CD8+ Т-клеток в течение более 1, 2, 3, 4, 5 или 6 недель или более. В некоторых вариантах осуществления способы позволяют получить композицию, содержащую клетку, которая выживает in vivo в присутствии CD8+ Т-клеток в течение по меньшей мере от одной недели до шести недель. В некоторых вариантах осуществления способы позволяют получить композицию, содержащую клетку, которая выживает in vivo в присутствии CD8+ Т-клеток в течение по меньшей мере от двух недель до четырех недель. В некоторых вариантах осуществления способы позволяют получить композицию, содержащую клетку, которая выживает in vivo в присутствии CD8+ Т-клеток в течение по меньшей мере четырех-шести недель. В некоторых вариантах осуществления способы позволяют получить композицию, содержащую клетку, которая выживает in vivo в присутствии CD8+ Т-клеток в течение более шести недель.

[00219] В некоторых вариантах осуществления способы позволяют получить композицию, содержащую клетку со сниженной или устраненной экспрессией MHC класса II и сниженной или устраненной экспрессией MHC класса I по сравнению с немодифицированной клеткой. В некоторых вариантах осуществления способы позволяют получить композицию, содержащую клетку со сниженной или устраненной экспрессией белка MHC класса II, сниженной или устраненной экспрессией белка CIITA и/или сниженным или устраненным уровнем CIITA в ядре клетки и/или устраненной или сниженной экспрессией белка MHC класса I. В некоторых вариантах осуществления способы позволяют получить композицию, содержащую клетку со сниженной или устраненной экспрессией белка MHC класса II, сниженной или устраненной экспрессией белка CIITA и/или сниженным или устраненным уровнем CIITA в ядре клетки и/или устраненной или сниженной экспрессией белка B2M. В некоторых вариантах осуществления способы позволяют получить композицию, содержащую клетку со сниженной или устраненной экспрессией белка MHC класса II, сниженной или

устраненной экспрессией белка CIITA и/или сниженным или устраненным уровнем CIITA в ядре клетки и/или сниженными или устраненными уровнями мРНК B2M. В некоторых вариантах осуществления клетка вызывает сниженный или устраненный ответ CD8+ Т-клеток.

[00220] В некоторых вариантах осуществления способы позволяют получить композицию, содержащую клетку со сниженной или устраненной экспрессией MHC класса II и сниженной или устраненной экспрессией HLA-A по сравнению с немодифицированной клеткой, где клетка является гомозиготной по HLA-B и гомозиготной по HLA-C. В некоторых вариантах осуществления способы позволяют получить композицию, содержащую клетку со сниженной или устраненной экспрессией белка MHC класса II, сниженной или устраненной экспрессией белка CIITA и/или сниженным или устраненным уровнем CIITA в ядре клетки и/или устраненной или сниженной экспрессией белка HLA-A. В некоторых вариантах осуществления способы позволяют получить композицию, содержащую клетку со сниженной или устраненной экспрессией белка MHC класса II, сниженной или устраненной экспрессией белка CIITA и/или сниженным или устраненным уровнем CIITA в ядре клетки и/или устраненной или сниженной экспрессией белка HLA-A. В некоторых вариантах осуществления клетка вызывает сниженный или устраненный ответ CD8+ Т-клеток.

[00221] В некоторых вариантах осуществления предложена сконструированная клетка, в которой снижена или устранена экспрессия белка MHC класса II и MHC класса I на клеточной поверхности, где клетка содержит генетическую модификацию в CIITA, и где клетка содержит модификацию в B2M. В некоторых вариантах осуществления аллогенная клетка вызывает сниженный ответ CD4+ Т-клеток и вызывает сниженный ответ CD8+ Т-клеток.

[00222] В некоторых вариантах осуществления предложена сконструированная клетка, в которой снижена или устранена экспрессия MHC класса II и белка HLA-A на клеточной поверхности, где клетка содержит генетическую модификацию в CIITA, и где клетка содержит генетическую модификацию в гене HLA-A, где клетка является гомозиготной по HLA-B и гомозиготной по HLA-C. В некоторых вариантах осуществления предложена сконструированная клетка, в которой снижена или устранена экспрессия MHC класса II и белка HLA-A на клеточной поверхности, где клетка содержит генетическую модификацию в CIITA, и где клетка содержит генетическую модификацию в гене HLA-A. В некоторых вариантах осуществления клетка является гомозиготной по HLA-B и HLA-C. В некоторых вариантах осуществления клетка вызывает сниженный ответ CD4+ Т-клеток и вызывает сниженный ответ CD8+ Т-клеток.

2. Экзогенные нуклеиновые кислоты

[00223] В некоторых вариантах осуществления в данном изобретении предложены способы и композиции для снижения или устранения экспрессии белка MHC класса II на поверхности клетки путем генетической модификации CIITA, как описано в данном документе, где способы и композиции дополнительно обеспечивают экспрессию

экзогенной нуклеиновой кислоты сконструированной клеткой.

Нокин ингибитора NK-клеток

[00224] В некоторых вариантах осуществления в данном изобретении предложены способы снижения или устранения экспрессии белка MHC класса II на поверхности клетки путем генетической модификации CIITA, как описано в данном документе, где способы дополнительно обеспечивают экспрессию экзогенной нуклеиновой кислоты клеткой, где экзогенная нуклеиновая кислота кодирует молекулу ингибитора NK-клеток. В некоторых вариантах осуществления молекула ингибитора NK-клеток экспрессируется на поверхности клетки, что позволяет избежать активности NK-клеток (*например*, лизиса клетки NK-клеткой). В некоторых вариантах осуществления способность генетически модифицированной клетки избегать лизиса NK-клеток делает клетку восприимчивой к терапии на основе адоптивного переноса клеток. В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой аллогенную клетку.

[00225] В некоторых вариантах осуществления способы включают снижение или устранение экспрессии белка MHC класса II на поверхности клетки, включая генетическую модификацию CIITA, включающую приведение клетки в контакт с композицией, содержащей CIITA-направленную РНК, описанную в данном документе, где способ дополнительно включает приведение клетки в контакт с нуклеиновой кислотой, кодирующей молекулу ингибитора NK-клеток. В некоторых вариантах осуществления способы включают снижение или устранение экспрессии белка MHC класса II на поверхности клетки, включая модификацию CIITA, включающую приведение клетки в контакт с композицией, содержащей описанную CIITA-направленную РНК, где способ дополнительно включает приведение клетки в контакт с нуклеиновой кислотой, кодирующей молекулу ингибитора NK-клеток, и B2M-направленной РНК, тем самым снижая или устраняя экспрессию белка MHC класса I на поверхности клетки. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает приведение клетки в контакт с РНК-направляемым ДНК-связывающим агентом.

[00226] В некоторых вариантах осуществления способы включают снижение или устранение экспрессии белка MHC класса II на поверхности клетки, включая генетическую модификацию клетки с помощью одной или нескольких композиций, содержащих CIITA-направленную РНК, описанную в данном документе, B2M-направленную РНК, нуклеиновую кислоту, кодирующую молекулу ингибитора NK-клеток, и РНК-направляемый ДНК-связывающий агент или нуклеиновую кислоту, кодирующую РНК-направляемый ДНК-связывающий агент.

[00227] В некоторых вариантах осуществления способы включают инактивацию сайта сплайсинга в CIITA, включая приведение в контакт клетки с композицией, содержащей CIITA-направленную РНК, описанную в данном документе, где способ дополнительно включает приведение в контакт клетки с нуклеиновой кислотой, кодирующей молекулу ингибитора NK-клеток. В некоторых вариантах осуществления способы включают инактивацию сайта сплайсинга в CIITA, включая приведение в

контакт клетки с композицией, содержащей CIITA-направленную РНК, описанную в данном документе, где способ дополнительно включает приведение в контакт клетки с нуклеиновой кислотой, кодирующей молекулу ингибитора NK-клеток, и B2M-направленной РНК, тем самым снижая экспрессию белка MHC класса I на поверхности клетки. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает приведение клетки в контакт с РНК-направляемым ДНК-связывающим агентом.

[00228] В некоторых вариантах осуществления способы включают индукцию DSB или SSB в CIITA, включая приведение в контакт клетки с композицией, содержащей CIITA-направленную РНК, описанную в данном документе, где способ дополнительно включает приведение в контакт клетки с нуклеиновой кислотой, кодирующей молекулу ингибитора NK-клеток. В некоторых вариантах осуществления способы включают индукцию DSB или SSB в CIITA, включая приведение в контакт клетки с композицией, содержащей CIITA-направленную РНК, описанную в данном документе, где способ дополнительно включает приведение в контакт клетки с нуклеиновой кислотой, кодирующей молекулу ингибитора NK-клеток, и B2M-направленной РНК, тем самым снижая экспрессию белка MHC класса I на поверхности клетки. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает приведение клетки в контакт с РНК-направляемым ДНК-связывающим агентом.

[00229] В некоторых вариантах осуществления способы включают снижение или устранение экспрессии белка CIITA в клетке, включая доставку композиции, содержащей CIITA-направленную РНК, описанную в данном документе, где способ дополнительно включает приведение клетки в контакт с нуклеиновой кислотой, кодирующей молекулу ингибитора NK-клеток. В некоторых вариантах осуществления способы включают снижение экспрессии белка CIITA в клетке, включая доставку композиции, содержащей CIITA-направленную РНК, описанную в данном документе, где способ дополнительно включает приведение клетки в контакт с нуклеиновой кислотой, кодирующей молекулу ингибитора NK-клеток, и B2M-направленной РНК, тем самым снижая экспрессию белка MHC класса I на поверхности клетки. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает приведение клетки в контакт с РНК-направляемым ДНК-связывающим агентом.

[00230] В некоторых вариантах осуществления молекула ингибитора NK-клетки связывается с ингибирующим рецептором на NK-клетке. В некоторых вариантах осуществления молекула ингибитора NK-клеток связывается с ингибирующим рецептором, специфичным для MHC класса I. В некоторых вариантах осуществления молекула ингибитора NK-клеток связывается с ингибирующим рецептором, который не является специфичным для MHC класса I. Рецепторы, ингибирующие NK-клетки, включают, *например*, KIR (человек), гетеродимер CD94-NKG2A (человека/мыши), Ly49 (мыши), 2B4, SLAMF6, NKFP-B, TIGIT, KIR2DL4.

[00231] В некоторых вариантах осуществления молекула ингибитора NK-клеток связывается с NKG2A.

[00232] В некоторых вариантах осуществления молекула ингибитора NK-клеток представляет собой молекулу MHC класса I. В некоторых вариантах осуществления молекула ингибитора NK-клеток представляет собой классическую молекулу MHC класса I. В некоторых вариантах осуществления молекула ингибитора NK-клеток представляет собой неклассическую молекулу MHC класса I. В некоторых вариантах осуществления молекула ингибитора NK-клеток представляет собой молекулу HLA. Молекулы ингибиторов NK-клеток включают, *например*, HLA-C, HLA-E, HLA-G, Cd1, CD48, SLAMF6, Clr-b и CD155.

[00233] В некоторых вариантах осуществления молекула ингибитора NK-клеток представляет собой HLA-E.

[00234] В некоторых вариантах осуществления молекула ингибитора NK-клеток представляет собой слитый белок. В некоторых вариантах осуществления молекула ингибитора NK-клеток представляет собой слитый белок, содержащий HLA-E. В некоторых вариантах осуществления молекула ингибитора NK-клеток включает B2M. В некоторых вариантах осуществления молекула ингибитора NK-клеток включает HLA-E и B2M. В некоторых вариантах осуществления слитый белок включает линкер. В некоторых вариантах осуществления конструкция HLA-E представлена в виде вектора. В некоторых вариантах осуществления вектор, содержащий конструкцию HLA-E, представляет собой лентивирусный вектор. В некоторых вариантах осуществления конструкция HLA-E доставляется в клетку посредством лентивирусной трансдукции.

[00235] В некоторых вариантах осуществления молекула ингибитора NK-клеток вставлена в геном целевой клетки. В некоторых вариантах осуществления молекула ингибитора NK-клеток интегрирована в геном целевой клетки. В некоторых вариантах осуществления молекула ингибитора NK-клеток интегрирована в геном целевой клетки путем гомологичной рекомбинации (ГР). В некоторых вариантах осуществления молекула ингибитора NK-клеток интегрирована в геном целевой клетки путем вставки с тупым концом. В некоторых вариантах осуществления молекула ингибитора NK-клеток интегрирована в геном целевой клетки путем негомологичного соединения концов. В некоторых вариантах осуществления молекула ингибитора NK-клеток интегрирована в безопасный локус в геноме клетки. В некоторых вариантах осуществления молекула ингибитора NK-клеток интегрирована в один из локусов: локус TRAC, локус B2M, локус AAVS1 и/или локус CIITA. В некоторых вариантах осуществления молекула ингибитора NK-клеток вводится в клетку в составной композиции липида и нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления составная композиция липида и нуклеиновой кислоты представляет собой липидную наночастицу (ЛНЧ).

[00236] В некоторых вариантах осуществления способы позволяют получить сконструированную клетку, которая вызывает ослабленный ответ NK-клеток. Ответ NK-клеток можно оценить in vitro или in vivo. В некоторых вариантах осуществления активность NK-клеток можно оценить путем совместного культивирования генетически модифицированных клеток с NK-клетками in vitro. В некоторых вариантах осуществления

активность NK-клеток можно оценивать на модели in vivo, *например*, на модели грызунов. В модели in vivo, *например*, генетически модифицированные клетки можно вводить вместе с NK-клетками; выживаемость генетически модифицированных клеток свидетельствует о способности избежать лизиса NK-клетками. В некоторых вариантах осуществления способы позволяют получить композицию, содержащую клетку, которая выживает in vivo в присутствии NK-клеток в течение более 1, 2, 3, 4, 5 или 6 недель или более. В некоторых вариантах осуществления способы позволяют получить композицию, содержащую клетку, которая выживает in vivo в присутствии NK-клеток в течение по меньшей мере от одной недели до шести недель. В некоторых вариантах осуществления способы позволяют получить композицию, содержащую клетку, которая выживает in vivo в присутствии NK-клеток в течение по меньшей мере от двух недель до четырех недель. В некоторых вариантах осуществления способы позволяют получить композицию, содержащую клетку, которая выживает in vivo в присутствии NK-клеток в течение по меньшей мере четырех-шести недель. В некоторых вариантах осуществления способы позволяют получить композицию, содержащую клетку, которая выживает in vivo в присутствии NK-клеток в течение более шести недель.

[00237] В некоторых вариантах осуществления способы позволяют получить композицию, содержащую сконструированную клетку со сниженной или устраненной экспрессией MHC класса II и содержащую нуклеиновую кислоту, кодирующую молекулу ингибитора NK-клеток. В некоторых вариантах осуществления способы позволяют получить композицию, содержащую сконструированную клетку, в которой снижена или устранена экспрессия MHC класса II и экспрессия молекулы ингибитора NK-клеток на поверхности клетки. В некоторых вариантах осуществления способы позволяют получить композицию, содержащую клетку со сниженной или устраненной экспрессией MHC класса II и вызывающую сниженный ответ NK-клеток. В некоторых вариантах осуществления способы позволяют получить композицию, содержащую клетку со сниженной или устраненной экспрессией белка MHC класса II, сниженной или устраненной экспрессией белка CIITA и/или сниженным или устраненным уровнем CIITA в ядре клетки, и вызывающую сниженный ответ NK-клеток, и снижение или устранение экспрессии белка MHC класса I. В некоторых вариантах осуществления клетка вызывает ослабленный ответ CD4+ Т-клеток, CD8+ Т-клеток и/или NK-клеток.

[00238] В некоторых вариантах осуществления предложена аллогенная клетка, в которой снижена или устранена экспрессия белков MHC класса II и MHC класса I на клеточной поверхности, где клетка содержит модификацию в CIITA, как описано в данном документе, где клетка содержит модификацию в B2M, и где клетка содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую молекулу ингибитора NK-клеток. В некоторых вариантах осуществления аллогенная клетка вызывает сниженный ответ CD4+ Т-клеток, CD8+ Т-клеток и/или NK-клеток.

Нацеливающие рецепторы и другие полипептиды, экспрессируемые на клеточной поверхности; секретируемые полипептиды

[00239] В некоторых вариантах осуществления в данном изобретении предложены способы снижения или устранения экспрессии белка MHC класса II на поверхности клетки путем генетической модификации CIITA, как описано в данном документе, где способы дополнительно обеспечивают экспрессию одной или нескольких экзогенных нуклеиновых кислот (*например*, антитело, химерный антигенный рецептор (CAR), Т-клеточный рецептор (TKP), цитокин или цитокиновый рецептор, хемокин или хемокиновый рецептор, фермент, слитый белок или другой тип связанного с клеточной поверхностью или растворимого полипептида). В некоторых вариантах осуществления экзогенная нуклеиновая кислота кодирует белок, который экспрессируется на поверхности клетки. Например, в некоторых вариантах осуществления экзогенная нуклеиновая кислота кодирует нацеливающий рецептор, который экспрессируется на поверхности клетки (описанный далее в настоящем документе). В некоторых вариантах осуществления генетически модифицированная клетка может функционировать как «клеточная фабрика» для экспрессии секретируемого полипептида, который кодируется экзогенной нуклеиновой кислотой, включая, *например*, источник для непрерывного производства полипептида in vivo (как описано далее в настоящем документе). В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой аллогенную клетку.

[00240] В некоторых вариантах осуществления способы включают снижение или устранение экспрессии белка MHC класса II на поверхности клетки, включая генетическую модификацию CIITA, включающую приведение клетки в контакт с композицией, содержащей CIITA-направленную РНК, как описано в данном документе, где способ дополнительно включает приведение клетки в контакт с экзогенной нуклеиновой кислотой. В некоторых вариантах осуществления способы включают снижение или устранение экспрессии белка MHC класса II на поверхности клетки, включая генетическую модификацию CIITA, включающую приведение клетки в контакт с композицией, содержащей CIITA-направленную РНК, как описано в данном документе, где способ дополнительно включает приведение клетки в контакт с экзогенной нуклеиновой кислотой и B2M-направленной РНК, тем самым снижая или устраняя экспрессию белка MHC класса I на поверхности клетки. В некоторых вариантах осуществления способы включают снижение или устранение экспрессии белка MHC класса II на поверхности клетки, включая генетическую модификацию сайта сплайсинга гена CIITA, включающую приведение клетки в контакт с композицией, содержащей CIITA-направленную РНК, как описано в данном документе, где способ дополнительно включает приведение клетки в контакт с экзогенной нуклеиновой кислотой, экспрессируемым на поверхности клетки (например, нацеливающим рецептором) или растворимым (например, секретируемым) полипептидом и B2M-направленной РНК, тем самым снижая или устраняя экспрессию белка MHC класса I на поверхности клетки. В некоторых вариантах осуществления способы включают приведение клетки в контакт с более чем одной экзогенной нуклеиновой кислотой. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает приведение клетки в контакт с РНК-

направляемым ДНК-связывающим агентом.

[00241] В некоторых вариантах осуществления способы включают снижение или устранение экспрессии белка МНС класса II на поверхности клетки, включая генетическую модификацию CIITA, включающую приведение клетки в контакт с композицией, содержащей CIITA-направленную РНК, как описано в данном документе, где способ дополнительно включает приведение клетки в контакт с экзогенной нуклеиновой кислотой. В некоторых вариантах осуществления способы включают снижение или устранение экспрессии белка МНС класса II на поверхности клетки, включая генетическую модификацию CIITA, включающую приведение клетки в контакт с композицией, содержащей CIITA-направленную РНК, как описано в данном документе, где способ дополнительно включает приведение клетки в контакт с экзогенной нуклеиновой кислотой и HLA-A-направленной РНК, тем самым уменьшая или устраняя экспрессию белка HLA-A на поверхности клетки. В некоторых вариантах осуществления способы включают снижение или устранение экспрессии белка HLA-A на поверхности клетки, включая генетическую модификацию сайта сплайсинга гена CIITA, включающую приведение клетки в контакт с композицией, содержащей CIITA-направленную РНК, как описано в данном документе, где способ дополнительно включает приведение клетки в контакт с экзогенной нуклеиновой кислотой, экспрессируемым на поверхности клетки (например, нацеливающим рецептором) или растворимым (например, секретируемым) полипептидом и HLA-A-направленной РНК, тем самым снижая или устраняя экспрессию белка HLA-A на поверхности клетки. В некоторых вариантах осуществления способы включают приведение клетки в контакт с более чем одной экзогенной нуклеиновой кислотой. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает приведение клетки в контакт с РНК-направляемым ДНК-связывающим агентом.

[00242] В некоторых вариантах осуществления способы включают снижение или устранение экспрессии белка МНС класса II на поверхности клетки, включая генетическую модификацию клетки с помощью одной или нескольких композиций, содержащих CIITA-направленную РНК, как описано в данном документе, B2M-направленную РНК, экзогенную нуклеиновую кислоту, кодирующую молекулу ингибитора NK-клеток, экзогенную нуклеиновую кислоту, кодирующую полипептид (*например*, нацеливающий рецептор), и РНК-направляемый ДНК-связывающий агент или нуклеиновую кислоту, кодирующую РНК-направляемый ДНК-связывающий агент.

[00243] В некоторых вариантах осуществления способы включают снижение или устранение экспрессии белка МНС класса II и белка МНС класса I на поверхности клетки, включая генетическую модификацию клетки с помощью одной или нескольких композиций, содержащих CIITA-направленную РНК, как описано в данном документе, B2M-направленную РНК, экзогенную нуклеиновую кислоту, кодирующую молекулу ингибитора NK-клеток, экзогенную нуклеиновую кислоту, кодирующую полипептид (*например*, нацеливающий рецептор), и РНК-направляемый ДНК-связывающий агент или нуклеиновую кислоту, кодирующую РНК-направляемый ДНК-связывающий агент.

[00244] В некоторых вариантах осуществления способы включают инактивацию сайта сплайсинга в CIITA, включая приведение в контакт клетки с композицией, содержащей CIITA-направленную РНК, как описано в данном документе, где способ дополнительно включает приведение в контакт клетки с экзогенной нуклеиновой кислотой. В некоторых вариантах осуществления способы включают инактивацию сайта сплайсинга в CIITA, включающую приведение клетки в контакт с композицией, содержащей CIITA-направленную РНК, которая, как описано в данном документе, дополнительно включает приведение клетки в контакт с экзогенной нуклеиновой кислотой и B2M-направленной, тем самым снижая экспрессия белка MHC класса I на поверхности клетки. В некоторых вариантах осуществления способы включают инактивацию сайта сплайсинга в CIITA, включая приведение в контакт клетки с композицией, содержащей CIITA-направленной РНК, как описано в данном документе, где способ дополнительно включает приведение в контакт клетки с экзогенной нуклеиновой кислотой, нуклеиновой кислотой, кодирующей ингибитор NK-клеток, и B2M-направленной РНК, тем самым снижая экспрессию белка MHC класса I на поверхности клетки. В некоторых вариантах осуществления способы включают инактивацию сайта сплайсинга в CIITA, включая приведение клетки в контакт с композицией, содержащей CIITA-направленную РНК, как описано в данном документе, где способ дополнительно включает приведение клетки в контакт с экзогенной нуклеиновой кислотой и нуклеиновой кислотой, кодирующей ингибитор NK-клеток. В некоторых вариантах осуществления способы включают приведение клетки в контакт с более чем одной экзогенной нуклеиновой кислотой. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает приведение клетки в контакт с РНК-направляемым ДНК-связывающим агентом.

[00245] В некоторых вариантах осуществления способы включают инактивацию сайта сплайсинга в CIITA, включая приведение в контакт клетки с композицией, содержащей CIITA-направленную РНК, как описано в данном документе, где способ дополнительно включает приведение в контакт клетки с экзогенной нуклеиновой кислотой. В некоторых вариантах осуществления способы включают инактивацию сайта сплайсинга в CIITA, включая приведение клетки в контакт с композицией, содержащей CIITA-направленную РНК, как описано в данном документе, где способ дополнительно включает приведение в контакт клетки с экзогенной нуклеиновой кислотой и HLA-A-направленной, тем самым снижая экспрессию белка HLA-A на поверхности клетки. В некоторых вариантах осуществления способы включают приведение клетки в контакт с более чем одной экзогенной нуклеиновой кислотой. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает приведение клетки в контакт с РНК-направляемым ДНК-связывающим агентом.

[00246] В некоторых вариантах осуществления экзогенная нуклеиновая кислота кодирует полипептид, который экспрессируется на поверхности клетки. В некоторых вариантах осуществления экзогенная нуклеиновая кислота кодирует растворимый

полипептид. В контексте настоящего документа термин «растворимый» полипептид относится к полипептиду, секретируемому клеткой. В некоторых вариантах осуществления растворимый полипептид представляет собой терапевтический полипептид. В некоторых вариантах осуществления растворимый полипептид представляет собой антитело. В некоторых вариантах осуществления растворимый полипептид представляет собой фермент. В некоторых вариантах осуществления растворимый полипептид представляет собой цитокин. В некоторых вариантах осуществления растворимый полипептид представляет собой хемокин. В некоторых вариантах осуществления растворимый полипептид представляет собой слитый белок.

[00247] В некоторых вариантах осуществления экзогенная нуклеиновая кислота кодирует антитело. В некоторых вариантах осуществления экзогенная нуклеиновая кислота кодирует фрагмент антитела (*например*, Fab, Fab2). В некоторых вариантах осуществления экзогенная нуклеиновая кислота кодирует полноразмерное антитело. В некоторых вариантах осуществления экзогенная нуклеиновая кислота кодирует одноцепочечное антитело (*например*, scFv). В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой IgG, IgM, IgD, IgA или IgE. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой антитело IgG. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой антитело IgG1. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой антитело IgG4. В некоторых вариантах осуществления константная область тяжелой цепи содержит мутации, которые, как известно, снижают эффекторные функции. В некоторых вариантах осуществления константная область тяжелой цепи содержит мутации, которые, как известно, усиливают эффекторные функции. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой биспецифическое антитело. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой однодоменное антитело (*например*, антитело, содержащее только домен VH).

[00248] В некоторых вариантах осуществления экзогенная нуклеиновая кислота кодирует нейтрализующее антитело. Нейтрализующее антитело нейтрализует активность антигена-мишени. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой нейтрализующее антитело против антигена вируса. В некоторых вариантах осуществления антитело нейтрализует целевой вирусный антиген, блокируя способность вируса инфицировать клетку. В некоторых вариантах осуществления для измерения нейтрализующей активности антитела можно применять клеточный анализ нейтрализации. Конкретные клетки и показания будут зависеть от целевого антигена нейтрализующего антитела. Полумаксимальная эффективная концентрация (EC_{50}) антитела может быть измерена в анализе нейтрализации на основе клеток, в которых более низкая EC_{50} свидетельствует о более сильнодействующем нейтрализующем антителе.

[00249] В некоторых вариантах осуществления экзогенная нуклеиновая кислота кодирует антитело, которое связывается с антигеном, связанным с заболеванием или

нарушением (*см., например*, заболевания и нарушения, описанные в Разделе IV).

[00250] В некоторых вариантах осуществления экзогенная нуклеиновая кислота кодирует полипептид, который экспрессируется на поверхности клетки (*т.е.* белок, связанный с поверхностью клетки). В некоторых вариантах осуществления экзогенная нуклеиновая кислота кодирует нацеливающий рецептор. «Нацеленный рецептор» представляет собой рецептор, присутствующий на поверхности клетки, например, Т-клетки, для обеспечения связывания клетки с целевым участком, например, конкретной клеткой или тканью в организме. В некоторых вариантах осуществления нацеливающий рецептор представляет собой CAR. В некоторых вариантах осуществления нацеливающий рецептор представляет собой универсальный CAR (UniCAR). В некоторых вариантах осуществления нацеливающий рецептор представляет собой TKP. В некоторых вариантах осуществления нацеливающий рецептор представляет собой TRuC. В некоторых вариантах осуществления нацеливающий рецептор представляет собой рецептор В-клеток (BCR) (например, экспрессированный на В-клетке). В некоторых вариантах осуществления нацеливающий рецептор представляет собой хемокиновый рецептор. В некоторых вариантах осуществления нацеливающий рецептор представляет собой цитокиновый рецептор.

[00251] В некоторых вариантах осуществления нацеливающие рецепторы включают химерный антигенный рецептор (CAR), Т-клеточный рецептор (TKP) и рецептор молекулы клеточной поверхности, функционально связанные по меньшей мере через трансмембранный домен во внутреннем сигнальном домене, способный активировать Т-клетку после связывания части внеклеточного рецептора. В некоторых вариантах осуществления CAR относится к внеклеточному домену распознавания антигена, например, scFv, VHH, нанотелу; функционально связан с внутриклеточным сигнальным доменом, который активирует Т-клетку при связывании антигена. CAR состоят из четырех областей: домена распознавания антигена, внеклеточной шарнирной области, трансмембранного домена и внутриклеточного сигнального домена Т-клеток. Такие рецепторы хорошо известны в данной области (см., например, WO2020092057, WO2019191114, WO2019147805, WO2018208837). Универсальный CAR (UniCAR) для распознавания различных антигенов (см., например, EP 2 990 416 A1) и обратный универсальный CAR (RevCAR), который способствует связыванию иммунной клетки с целевой клеткой через адаптерную молекулу (см., например, WO 2019238722) также рассматриваются. CAR могут быть нацелены на любой антиген, к которому может быть разработано антитело, и, как правило, направлены на молекулы, расположенные на поверхности клетки или ткани, на которые должны быть нацелены. В некоторых вариантах осуществления нацеливающий рецептор содержит домен распознавания антигена (например, домен распознавания ракового антигена и субъединицу TKP (например, TRuC) (*см.* Baeuerle et al. Nature Communications 2087 (2019).)

[00252] В некоторых вариантах осуществления экзогенная нуклеиновая кислота кодирует TKP. В некоторых вариантах осуществления экзогенная нуклеиновая кислота

кодирует генетически модифицированный ТКР. В некоторых вариантах осуществления экзогенная нуклеиновая кислота кодирует генетически модифицированный ТКР со специфичностью в отношении полипептида, который экспрессируется раковыми клетками. В некоторых вариантах осуществления экзогенная нуклеиновая кислота кодирует нацеливающий рецептор, специфичный к антигену гена опухоли Вильмса (WT1; англ.: Wilms' tumor). В некоторых вариантах осуществления экзогенная нуклеиновая кислота кодирует WT1-специфичный ТКР (*см.*, например, WO2020/081613A1).

[00253] В некоторых вариантах осуществления экзогенная нуклеиновая кислота встраивается в геном целевой клетки. В некоторых вариантах экзогенная нуклеиновая кислота интегрирована в геном целевой клетки. В некоторых вариантах осуществления экзогенная нуклеиновая кислота интегрирована в геном целевой клетки путем гомологичной рекомбинации (HR). В некоторых вариантах осуществления экзогенная нуклеиновая кислота интегрирована в геном целевой клетки путем вставки с тупым концом. В некоторых вариантах осуществления экзогенная нуклеиновая кислота интегрирована в геном целевой клетки путем негомологичного соединения концов. В некоторых вариантах осуществления экзогенная нуклеиновая кислота интегрирована в безопасный локус в геноме клетки. В некоторых вариантах осуществления экзогенная нуклеиновая кислота интегрирована в один из локусов TRAC, локуса B2M, локуса AAVS1 и/или локуса CIITA. В некоторых вариантах осуществления экзогенная нуклеиновая кислота вводится в клетку в составной композиции липида и нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления составная композиция липида и нуклеиновой кислоты представляет собой липидную наночастицу (ЛНЧ).

[00254] В некоторых вариантах осуществления способы позволяют получить композицию, содержащую сконструированную клетку со сниженной или устраненной экспрессией МНС класса II и содержащую экзогенную нуклеиновую кислоту. В некоторых вариантах осуществления способы позволяют получить композицию, содержащую сконструированную клетку со сниженной или устраненной экспрессией МНС класса II, которая секретирует и/или экспрессирует полипептид, который кодируется экзогенной нуклеиновой кислотой, интегрированной в геном клетки. В некоторых вариантах осуществления способы позволяют получить композицию, содержащую сконструированную клетку со сниженной или устраненной экспрессией белка МНС класса II, сниженной или устраненной экспрессией белка CIITA и/или сниженным или устраненным уровнем CIITA в ядре клетки, и вызывающую сниженный ответ со стороны NK-клеток, и имеющую сниженную экспрессию белка МНС класса I и секретирующую и/или экспрессирующую полипептид, кодируемый экзогенной нуклеиновой кислотой, интегрированной в геном клетки. В некоторых вариантах осуществления сконструированная клетка вызывает ослабленный ответ CD4+ Т-клеток и/или CD8+ Т-клеток.

[00255] В некоторых вариантах осуществления предложена сконструированная клетка, в которой снижена или устранена экспрессия белка МНС класса II и МНС класса I

на клеточной поверхности, при это клетка содержит модификацию в CIITA, как описано в данном документе, где клетка содержит модификацию в B2M, где клетка содержит экзогенную нуклеиновую кислоту, кодирующую молекулу ингибитора NK-клеток, и где клетка дополнительно содержит экзогенную нуклеиновую кислоту, кодирующую полипептид (например, нацеливающий рецептор). В некоторых вариантах осуществления сконструированная клетка вызывает ослабленный ответ CD4+ Т-клеток и/или CD8+ Т-клеток.

[00256] В вариантах осуществления предоставляется сконструированная клетка, в которой клетка имеет сниженную или устраненную экспрессию MHC класса II и белка HLA-A на клеточной поверхности, где клетка содержит модификацию CIITA, как описано в данном документе, где клетка содержит модификацию в гене HLA-A, где клетка дополнительно содержит экзогенную нуклеиновую кислоту, кодирующую полипептид (например, нацеливающий рецептор). В некоторых вариантах осуществления сконструированная клетка вызывает ослабленный ответ CD4+ Т-клеток и/или CD8+ Т-клеток.

[00257] В некоторых вариантах осуществления в данном изобретении предложены способы снижения или устранения экспрессии белка MHC класса II на поверхности клетки путем генетической модификации CIITA, как описано в настоящем документе, где способы дополнительно обеспечивают снижение экспрессии одного или большего количества дополнительных целевых генов (*например*, TRAC, TRBC). В некоторых вариантах осуществления дополнительные генетические модификации обеспечивают дополнительные преимущества применения генетически модифицированных клеток для адоптивного переноса клеток. В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой аллогенную клетку.

[00258] В некоторых вариантах осуществления способы включают снижение или устранение экспрессии белка MHC класса II на поверхности клетки, включая генетическую модификацию CIITA, включающую приведение в контакт клетки с композицией, содержащей CIITA-направленную РНК, как описано в данном документе, где способ дополнительно включает приведение в контакт клетки с направляющей РНК, которая направляет РНК-направляемый ДНК-связывающий агент к целевой последовательности, расположенной в другом гене (*например*, в гене, отличном от CIITA, или B2M, или HLA-A), тем самым снижая или устраняя экспрессию другого гена. В некоторых вариантах осуществления способы включают снижение экспрессии белка MHC класса II на поверхности клетки, включая генетическую модификацию CIITA, включающую приведение клетки в контакт с композицией, содержащей CIITA-направленную РНК, как описано в данном документе, где способ дополнительно включает приведение клетки в контакт с направляющей РНК, которая направляет РНК-направляемый ДНК-связывающий агент к целевой последовательности, расположенной в другом гене, и B2M-направленной РНК, тем самым снижая или устраняя экспрессию белка MHC класса I на поверхности клетки. В некоторых вариантах осуществления

способы включают снижение или устранение экспрессии белка MHC класса II на поверхности клетки, включая генетическую модификацию CIITA, включающую приведение в контакт клетки с композицией, содержащей CIITA-направленную РНК, как описано в данном документе, где способ дополнительно включает приведение в контакт клетки с направляющей РНК, которая направляет РНК-направляемый ДНК-связывающий агент к целевой последовательности, расположенной в другом гене, тем самым снижая или устраняя экспрессию другого гена и экзогенной нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид (например, нацеливающий рецептор).

[00259] В некоторых вариантах осуществления способы включают снижение или устранение экспрессии белка MHC класса II на поверхности клетки, включая генетическую модификацию CIITA, включающую приведение в контакт клетки с композицией, содержащей CIITA-направленную РНК, как описано в данном документе, где способ дополнительно включает приведение в контакт клетки с направляющей РНК, которая направляет РНК-направляемый ДНК-связывающий агент к целевой последовательности, расположенной в другом гене, B2M-направленной РНК, тем самым снижая экспрессию белка MHC класса I на поверхности клетки, и экзогенной нуклеиновой кислоты, кодирующей ингибитор NK-клеток.

[00260] В некоторых вариантах осуществления способы включают снижение или устранение экспрессии белка MHC класса II на поверхности клетки, включая генетическую модификацию CIITA, включающую приведение клетки в контакт с композицией, содержащей CIITA-направленную РНК, как описано в данном документе, где способ дополнительно включает приведение клетки в контакт с направляющей РНК, которая направляет РНК-направляемый ДНК-связывающий агент к целевой последовательности, расположенной в другом гене, HLA-A направленной РНК, тем самым снижая экспрессию другого гена и направляющей РНК HLA-A, и снижая экспрессию белка HLA-A на поверхности клетки.

[00261] В некоторых вариантах осуществления способы включают снижение или устранение экспрессии белка MHC класса II на поверхности клетки, включая генетическую модификацию CIITA, включающую приведение в контакт клетки с композицией, содержащей CIITA-направленную РНК, как описано в данном документе, где способ дополнительно включает приведение в контакт клетки с направляющей РНК, которая направляет РНК-направляемый ДНК-связывающий агент к целевой последовательности, расположенной в другом гене, B2M-направленной РНК, тем самым снижая экспрессию белка MHC класса I на поверхности клетки, и экзогенной нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид (например, нацеливающий рецептор).

[00262] В некоторых вариантах осуществления способы включают снижение или устранение экспрессии белка MHC класса II на поверхности клетки, включая генетическую модификацию CIITA, включающую приведение в контакт клетки с композицией, содержащей CIITA-направленную РНК, как описано в данном документе, где способ дополнительно включает приведение в контакт клетки с направляющей РНК,

которая направляет РНК-направляемый ДНК-связывающий агент к целевой последовательности, расположенной в другом гене, экзогенной нуклеиновой кислотой, кодирующей молекулу ингибитора NK-клеток, и экзогенной нуклеиновой кислотой, кодирующей полипептид (например, нацеливающий рецептор).

[00263] В некоторых вариантах осуществления способы включают снижение или устранение экспрессии белка МНС класса II на поверхности клетки, включая генетическую модификацию CIITA, включающую приведение клетки в контакт с композицией, содержащей CIITA-направленную РНК, как описано в данном документе, где способ дополнительно включает приведение клетки в контакт с направляющей РНК, которая направляет РНК-направляемый ДНК-связывающий агент к целевой последовательности, расположенной в другом гене, HLA-A направленной РНК, тем самым снижая экспрессию белка HLA-A на поверхности клетки и экзогенной нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид (например, нацеливающий рецептор).

[00264] В некоторых вариантах осуществления способы включают снижение или устранение экспрессии белка МНС класса II на поверхности клетки, включая генетическую модификацию CIITA, включающую приведение в контакт клетки с композицией, содержащей CIITA-направленную РНК, как описано в данном документе, где способ дополнительно включает приведение в контакт клетки с направляющей РНК, которая направляет РНК-направляемый ДНК-связывающий агент к целевой последовательности, расположенной в другом гене, тем самым снижая или устраняя экспрессию дополнительного гена, B2M-направленной РНК, которая направляет РНК-направляемый ДНК-связывающий агент к целевой последовательности, расположенной в другом гене, тем самым снижая или устраняя экспрессию белка МНС класса I на поверхности клетки, экзогенной нуклеиновой кислоты, кодирующей молекулу ингибитора NK-клеток, и экзогенной нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид (например, нацеливающий рецептор). В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает приведение клетки в контакт с РНК-направляемым ДНК-связывающим агентом.

[00265] В некоторых вариантах осуществления способы включают снижение или устранение экспрессии белка МНС класса II на поверхности клетки, включая генетическую модификацию клетки с помощью одной или более композиций, содержащих CIITA-направленную РНК, как описано в данном документе, B2M-направленную РНК, экзогенную нуклеиновую кислоту, кодирующую молекулу ингибитора NK-клеток, экзогенную нуклеиновую кислоту, кодирующую полипептид (например, нацеливающий рецептор), направляющую РНК, которая направляет РНК-направляемый ДНК-связывающий агент к целевой последовательности, расположенной в другом гене, тем самым снижая или устраняя экспрессию другого гена и РНК-направляемого ДНК-связывающего агента или нуклеиновой кислоты, кодирующей РНК-направляемый ДНК-связывающий агент.

[00266] В некоторых вариантах осуществления способы включают снижение или устранение экспрессии белка МНС класса II на поверхности клетки, включая

генетическую модификацию клетки с помощью одной или нескольких композиций, содержащих CIITA-направленную РНК, как описано в данном документе, HLA-A-направленную РНК, экзогенную нуклеиновую кислоту, кодирующую полипептид (например, нацеливающий рецептор), направляющую РНК, которая направляет РНК-направляемый ДНК-связывающий агент к целевой последовательности, расположенной в другом гене, тем самым снижая или устраняя экспрессию другого гена и РНК-направляемого ДНК-связывающего агента или нуклеиновой кислоты, кодирующей РНК-направляемый ДНК-связывающий агент.

[00267] В некоторых вариантах осуществления , дополнительный целевой ген представляет собой TRAC. В некоторых вариантах осуществления , дополнительный целевой ген представляет собой TRBC.

Типичные типы клеток

[00268] В некоторых вариантах осуществления способы и композиции, описанные в настоящем документе, генетически модифицируют клетку. В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой аллогенную клетку. В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой клетку человека. В некоторых вариантах осуществления генетически модифицированная клетка называется сконструированной клеткой. Сконструированная клетка относится к клетке (или потомству клетки), содержащей сконструированную генетическую модификацию, *например*, которая контактировала с системой редактирования генов и генетически модифицирована системой редактирования генов. Термины «сконструированная клетка» и «генетически модифицированная клетка» применяются взаимозаменяемо. Сконструированная клетка может представлять собой любой из типичных типов клеток, описанных в данном документе.

[00269] В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой иммунную клетку. В контексте настоящего документа термин «иммунная клетка» относится к клетке иммунной системы, включая, *например*, лимфоцит (*например*, Т-клетку, В-клетку, естественную киллерную клетку («NK-клетку» и NKT-клетку или iNKT-клетку)), моноциты, макрофаги, тучные клетки, дендритные клетки или гранулоциты (*например*, нейтрофилы, эозинофилы и базофилы). В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой первичную иммунную клетку. В некоторых вариантах осуществления клетка иммунной системы может быть выбрана из $CD3^+$, $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-клеток, регуляторных Т-клеток (Tregs), В-клеток, NK-клеток и дендритных клеток (DC). В некоторых вариантах осуществления иммунная клетка является аллогенной.

[00270] В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой лимфоцит. В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой адаптивную иммунную клетку. В некоторых вариантах осуществления указанная клетка представляет собой Т-клетку. В некоторых вариантах осуществления указанная клетка представляет собой В-клетку. В некоторых вариантах осуществления указанная клетка представляет собой NK-клетку. В некоторых вариантах осуществления лимфоцит является аллогенным.

[00271] В контексте настоящего документа термин Т-клетка может быть определена как клетка, которая экспрессирует Т-клеточный рецептор («TCR» или «αβ TCR» или «γδ TCR»), однако в некоторых вариантах осуществления настоящего документа TCR Т-клетки может быть генетически модифицирован для снижения его экспрессии (*например*, путем генетической модификации генов TRAC или TRBC), поэтому экспрессию белка CD3 можно применять в качестве маркера для идентификации Т-клетки согласно стандартным методам проточной цитометрии. CD3 представляет собой многосубъединичный сигнальный комплекс, связанный с TCR. Таким образом, Т-клетка может быть названа как CD3+. В некоторых вариантах осуществления настоящего документа Т-клетка представляет собой клетку, которая экспрессирует маркер CD3+ и либо маркер CD4+, либо маркер CD8+. В некоторых вариантах осуществления Т-клетка является аллогенной.

[00272] В некоторых вариантах осуществления Т-клетка экспрессирует гликопротеин CD8 и, таким образом, CD8+ согласно стандартным методам проточной цитометрии может называться «цитотоксичной» Т-клеткой. В некоторых вариантах осуществления Т-клетка экспрессирует гликопротеин CD4 и, таким образом, CD4+ согласно стандартным методам проточной цитометрии может называться «хелперной» Т-клеткой. CD4+ Т-клетки могут дифференцироваться в подмножества и могут называться Th1 клетками, Th2 клетками, Th9 клетками, Th17 клетками, Th22 клетками, Т-регуляторными («Treg») клетками или Т-фолликулярными хелперными клетками («Tfh»). Каждое подмножество CD4+ высвобождает специфические цитокины, которые могут иметь либо провоспалительные, либо противовоспалительные функции, функции выживания или защитные функции. Т-клетка может быть выделена из субъекта методами селекции CD4+ или CD8+.

[00273] В некоторых вариантах осуществления Т-клетка представляет собой Т-клетку памяти. В организме Т-клетка памяти столкнулась с антигеном. Т-клетки памяти могут располагаться во вторичных лимфоидных органах (центральные Т-клетки памяти) или в недавно инфицированной ткани (эффекторные Т-клетки памяти). Т-клеткой памяти может быть CD8+ Т-клетка. Т-клеткой памяти может быть CD4+ Т-клетка.

[00274] В контексте настоящего документа термин «центральная Т-клетка памяти» может называться как Т-клетка, контактирующая с антигеном, и, например, может экспрессировать CD62L и CD45RO. Центральная Т-клетки памяти могут быть обнаружены как CD62L+ и CD45RO+ Центральными Т-клетками памяти, которые также экспрессируют CCR7, поэтому могут быть обнаружены CCR7+ согласно стандартным методам проточной цитометрии.

[00275] В контексте настоящего документа термин «ранняя Т-клетка памяти стволовых клеток» (или «Tscm») может называтся как Т-клетка, которая экспрессирует CD27 и CD45RA и, следовательно, представляет собой CD27+ и CD45RA+ согласно стандартным методам проточной цитометрии. Tscm не экспрессирует изоформу CD45 CD45RO, поэтому Tscm далее будет CD45RO- при окрашивании на эту изоформу

согласно стандартным методам проточной цитометрии. Следовательно, клетка CD45RO-CD27+ также представляет собой раннюю Т-клетку памяти стволовых клеток. Tscm Клетки дополнительно экспрессируют CD62L и CCR7, поэтому могут быть обнаружены как CD62L+ и CCR7+ согласно стандартным методам проточной цитометрии. Было продемонстрировано, что ранние Т-клетки памяти стволовых клеток коррелируют с повышенной стойкостью и терапевтической эффективностью продуктов клеточной терапии.

[00276] В некоторых вариантах осуществления указанная клетка представляет собой В-клетку. В контексте настоящего документа термин «В-клетка» может быть определен как клетка, которая экспрессирует CD19 и/или CD20, и/или зрелый антиген В-клетки («BCMA»), и, следовательно, В-клетка представляет собой CD19+ и/или CD20+, и /или BCMA+ согласно стандартным методам проточной цитометрии. Кроме того, В-клетка является отрицательной в отношении CD3 и CD56 согласно стандартным методам проточной цитометрии. В-клетка может быть плазматической клеткой. В-клетка может быть В-клеткой памяти. В-клетка может быть наивной В-клеткой. В-клетка может быть IgM+ или иметь В-клеточный рецептор с переключением класса (*например*, IgG+ или IgA+). В некоторых вариантах осуществления В-клетка является аллогенной.

[00277] В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой мононуклеарную клетку, например, из костного мозга или периферической крови. В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой мононуклеарную клетку периферической крови (“PBMC”). В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой PBMC, *например* лимфоцит или моноцит. В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой лимфоцит периферической крови (“PBL”). В некоторых вариантах осуществления мононуклеарная клетка является аллогенной.

[00278] Включены клетки, применяемые в терапии на основе АПК и/или регенеративной терапии тканей, такие как стволовые клетки, клетки-предшественники и первичные клетки. Стволовые клетки, например, включают плюрипотентные стволовые клетки (PSCs); индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (iPSCs); эмбриональные стволовые клетки (ESCs); мезенхимальные стволовые клетки (MSCs, *например*, выделенные из костного мозга (BM), периферической крови (PB), плаценты, пуповины (UC) или жировой ткани); гемопоэтические стволовые клетки (HSCs; *например*, выделенные из BM или UC); нейральные стволовые клетки (NSCs); тканеспецифические стволовые клетки-предшественники (TSPSC); и лимбальные стволовые клетки (LSCs). Прогениторные и первичные клетки включают мононуклеарные клетки (MNCs, *например*, выделенные из BM или PB); эндотелиальные клетки-предшественники (EPC, *например*, выделенные из BM, PB и UC); нейральные клетки-предшественники (NPC); и тканеспецифические первичные клетки или полученные из них клетки (TSC), включая хондроциты, миоциты и кератиноциты. Также включены клетки для трансплантации органов или тканей, такие как островковые клетки, кардиомиоциты, клетки щитовидной железы, тимоциты, нейрональные клетки, клетки кожи и клетки сетчатки.

[00279] В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой клетку человека, такую как клетка, выделенная от человека. В некоторых вариантах осуществления клетки выделяют из PBMC или лейкопаков донора человека. В некоторых вариантах осуществления клетка получена от субъекта с состоянием, нарушением или заболеванием. В некоторых вариантах осуществления клетка получена от донора человека с вирусом Эпштейна-Барр («EBV»).

[00280] В некоторых вариантах осуществления способы осуществляются ex vivo. В контексте настоящего документа термин «ex vivo» относится к методу in vitro, при котором клетка может быть перенесена субъекту, *например*, в качестве терапии на основе АПК. В некоторых вариантах осуществления метод ex vivo представляет собой метод in vitro, включающий клетки или клеточную популяцию для терапии на основе АПК.

[00281] В некоторых вариантах осуществления клетка происходит из клеточной линии. В некоторых вариантах осуществления клеточная линия получена от человека. В некоторых вариантах осуществления клеточная линия представляет собой лимфобластоидную клеточную линию («LCL»). Клетка может быть криоконсервирована и разморожена. Клетка, возможно, ранее не подвергалась криоконсервации.

[00282] В некоторых вариантах осуществления клетка получена из банка клеток. В некоторых вариантах осуществления клетку генетически модифицируют, а затем переносят в банк клеток. В некоторых вариантах осуществления клетка удаляется у субъекта, генетически модифицируется ex vivo и переносится в банк клеток. В некоторых вариантах осуществления генетически модифицированную популяцию клеток переносят в банк клеток. В некоторых вариантах осуществления генетически модифицированную популяцию иммунных клеток переносят в банк клеток. В некоторых вариантах осуществления в банк клеток переносят генетически модифицированную популяцию иммунных клеток, включающую первую и вторую субпопуляции, где первая и вторая субпопуляции имеют по меньшей мере одну общую генетическую модификацию и по меньшей мере одну отличающуюся генетическую модификацию.

[00283] В некоторых вариантах осуществления, когда клетка является гомозиготной по HLA-B, аллель HLA-B выбран из любого из следующих аллелей HLA-B: HLA-B*07:02; HLA-B*08:01; HLA-B*44:02; HLA-B*35:01; HLA-B*40:01; HLA-B*57:01; HLA-B*14:02; HLA-B*15:01; HLA-B*13:02; HLA-B*44:03; HLA-B*38:01; HLA-B*18:01; HLA-B*44:03; HLA-B*51:01; HLA-B*49:01; HLA-B*15:01; HLA-B*18:01; HLA-B*27:05; HLA-B*35:03; HLA-B*18:01; HLA-B*52:01; HLA-B*51:01; HLA-B*37:01; HLA-B*53:01; HLA-B*55:01; HLA-B*44:02; HLA-B*44:03; HLA-B*35:02; HLA-B*15:01; и HLA-B*40:02.

[00284] В некоторых вариантах осуществления, когда клетка является гомозиготной по HLA-C, аллель HLA-C выбран из любого из следующих аллелей HLA-C: HLA-C*07:02; HLA-C*07:01; HLA-C*05:01; HLA-C*04:01 HLA-C*03:04; HLA-C*06:02; HLA-C*08:02; HLA-C*03:03; HLA-C*06:02; HLA-C*16:01; HLA-C*12:03; HLA-C*07:01; HLA-C*04:01; HLA-C*15:02; HLA-C*07:01; HLA-C*03:04; HLA-C*12:03; HLA-C*02:02; HLA-C*04:01; HLA-C*05:01; HLA-C*12:02; HLA-C*14:02; HLA-C*06:02; HLA-C*04:01;

HLA-C*03:03; HLA-C*07:04; HLA-C*07:01; HLA-C*04:01; HLA-C*04:01; и HLA-C*02:02.

[00285] В некоторых вариантах осуществления клетка является гомозиготной по HLA-B и гомозиготной по HLA-C, и аллель HLA-B выбран из любого из следующих аллелей HLA-B: HLA-B*07:02; HLA-B*08:01; HLA-B*44:02; HLA-B*35:01; HLA-B*40:01; HLA-B*57:01; HLA-B*14:02; HLA-B*15:01; HLA-B*13:02; HLA-B*44:03; HLA-B*38:01; HLA-B*18:01; HLA-B*44:03; HLA-B*51:01; HLA-B*49:01; HLA-B*15:01; HLA-B*18:01; HLA-B*27:05; HLA-B*35:03; HLA-B*18:01; HLA-B*52:01; HLA-B*51:01; HLA-B*37:01; HLA-B*53:01; HLA-B*55:01; HLA-B*44:02; HLA-B*44:03; HLA-B*35:02; HLA-B*15:01 и HLA-B*40:02; и аллель HLA-C выбран из любого из следующих аллелей HLA-C: HLA-C*07:02; HLA-C*07:01; HLA-C*05:01; HLA-C*04:01 HLA-C*03:04; HLA-C*06:02; HLA-C*08:02; HLA-C*03:03; HLA-C*06:02; HLA-C*16:01; HLA-C*12:03; HLA-C*07:01; HLA-C*04:01; HLA-C*15:02; HLA-C*07:01; HLA-C*03:04; HLA-C*12:03; HLA-C*02:02; HLA-C*04:01; HLA-C*05:01; HLA-C*12:02; HLA-C*14:02; HLA-C*06:02; HLA-C*04:01; HLA-C*03:03; HLA-C*07:04; HLA-C*07:01; HLA-C*04:01; HLA-C*04:01; и HLA-C*02:02.

[00286] В некоторых вариантах осуществления клетка является гомозиготной по HLA-B и гомозиготной по HLA-C , и аллели HLA-B и HLA-C выбраны из любого из следующих аллелей HLA-B и HLA-C: HLA-B*07:02 и HLA-C*07:02; HLA-B*08:01 и HLA-C*07:01; HLA-B*44:02 и HLA-C*05:01; HLA-B*35:01 и HLA-C*04:01; HLA-B*40:01 и HLA-C*03:04; HLA-B*57:01 и HLA-C*06:02; HLA-B*14:02 и HLA-C*08:02; HLA-B*15:01 и HLA-C*03:03; HLA-B*13:02 и HLA-C*06:02; HLA-B*44:03 и HLA-C*16:01; HLA-B*38:01 и HLA-C*12:03; HLA-B*18:01 и HLA-C*07:01; HLA-B*44:03 и HLA-C*04:01; HLA-B*51:01 и HLA-C*15:02; HLA-B*49:01 и HLA-C*07:01; HLA-B*15:01 и HLA-C*03:04; HLA-B*18:01 и HLA-C*12:03; HLA-B*27:05 и HLA-C*02:02; HLA-B*35:03 и HLA-C*04:01; HLA-B*18:01 и HLA-C*05:01; HLA-B*52:01 и HLA-C*12:02; HLA-B*51:01 и HLA-C*14:02; HLA-B*37:01 и HLA-C*06:02; HLA-B*53:01 и HLA-C*04:01; HLA-B*55:01 и HLA-C*03:03; HLA-B*44:02 и HLA-C*07:04; HLA-B*44:03 и HLA-C*07:01; HLA-B*35:02 и HLA-C*04:01; HLA-B*15:01 и HLA-C*04:01; и HLA-B*40:02 и HLA-C*02:02. В некоторых вариантах осуществления клетка является гомозиготной по HLA-B и гомозиготной по HLA-C, а аллели HLA-B и HLA-C представляют собой HLA-B*07:02 и HLA-C*07:02. В некоторых вариантах осуществления клетка является гомозиготной по HLA-B и гомозиготной по HLA-C, а аллели HLA-B и HLA-C представляют собой HLA-B*08:01 и HLA-C*07:01. В некоторых вариантах осуществления клетка является гомозиготной по HLA-B и гомозиготной по HLA-C, а аллели HLA-B и HLA-C представляют собой HLA-B*44:02 и HLA-C*05:01. В некоторых вариантах осуществления клетка является гомозиготной по HLA-B и гомозиготной по HLA-C, а аллели HLA-B и HLA-C представляют собой HLA-B*35:01 и HLA-C*04:01.

Подробное описание систем редактирования генов

[00287] Для создания описанных в данном документе сконструированных клеток можно применять различные подходящие системы редактирования генов, включая, но не ограничиваясь этим, систему CRISPR/Cas; система нуклеаз цинковых пальцев (ZFN); и

система эффекторных нуклеаз, подобная активатору транскрипции (TALEN).Как правило, системы редактирования генов включают применение сконструированных систем расщепления для индуцирования двухцепочечного разрыва (DSB) или разрыва (например, одноцепочечного разрыва или SSB) в целевой последовательности ДНК. Расщепление или разрыв может происходить с помощью специфических нуклеаз, таких как сконструированные ZFN, TALEN, или с применением системы CRISPR/Cas со сконструированной РНК-направляемой для управления специфическим расщеплением или разрыв целевой последовательности ДНК. Кроме того, на основе системы Argonaute разрабатываются адресные нуклеазы (например, из T. thermophilus, известного как «TtAgo», см. Swarts et al (2014) Nature 507(7491): 258-261), которые также могут иметь потенциал для применения в редактировании генов и генной терапии.

[00288] В некоторых вариантах осуществления система редактирования генов представляет собой систему TALEN. Эффекторные нуклеазы, подобные активаторам транскрипции (TALEN), представляют собой рестрикционные ферменты, которые можно сконструировать для разрезания определенных последовательностей ДНК. Их получают путем слияния эффекторного ДНК-связывающего домена TAL с доменом расщепления ДНК (нуклеаза, которая разрезает нити ДНК). Эффекторы, подобные активаторам транскрипции (TALEs), могут быть сконструированы для связывания с желаемой последовательностью ДНК, чтобы способствовать расщеплению ДНК в определенных местах (см., например, Boch, 2011, Nature Biotech). Ферменты рестрикции могут быть введены в клетки для применения при редактирования генов in situ, метод, известный как редактирование генов с помощью инженерных нуклеаз. Такие способы и композиции для их применения известны в данной области техники. См., например, WO 2019147805, WO 2014040370, WO 2018073393, содержание которых в настоящий документ включено посредством ссылки.

[00289] В некоторых вариантах осуществления система редактирования генов представляет собой систему цинковых пальцев. Нуклеазы цинковых пальцев (ZFN) представляют собой искусственные рестрикционные ферменты, генерируемые путем слияния ДНК-связывающего домена цинковых пальцев с доменом расщепления ДНК. Домены цинковых пальцев могут быть сконструированы для нацеливания на определенные желаемые последовательности ДНК, чтобы позволить нуклеазам цинковых пальцев нацеливаться на уникальные последовательности в комплексных геномах. Домен неспецифического расщепления эндонуклеазы рестрикции II типа FokI обычно применяется в качестве домена расщепления в ZFN. Расщепление восстанавливается с помощью эндогенного механизма репарации ДНК, что позволяет ZFN точно изменять геномы высших организмов. Такие способы и композиции для их применения известны в данной области техники. См., например, WO 2011091324, содержание которой включено настоящий документ посредством ссылки.

[00290] В некоторых вариантах осуществления система редактирования генов представляет собой систему CRISPR/Cas, включающую, например, РНК-направляемую

CRISPR, содержащую направляющую последовательность и РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, и дополнительно описана в настоящем документе.

Направляющая РНК CRISPR

[00291] В настоящем документе представлены направляющие последовательности, применимые для модификации целевые последовательности, *например*, с применением, содержащей описанную направляющую последовательность, с РНК-направляемой ДНК-связывающим агентом (*например*, системой CRISPR/Cas).

[00292] Каждая из описанных в данном документе направляющих последовательностей может дополнительно содержать дополнительные нуклеотиды для образования crРНК, например, со следующей типовой последовательностью нуклеотидов, следующей за направляющей последовательностью на ее 3'-конце: GUUUUAGAGCUAUGCUGUUUUG (SEQ ID NO: 170) в ориентации от 5' к 3'. В случае онРНК указанные выше направляющие последовательности могут дополнительно содержать дополнительные нуклеотиды (каркасная последовательность) для образования онРНК, например, со следующей типовой последовательностью нуклеотидов, следующей за 3'-концом направляющей последовательности: GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU (SEQ ID NO: 171) или GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGC (SEQ ID NO: 172, которая представляет собой SEQ ID NO: 171 без четырех концевых U) в ориентации от 5' к 3'. В некоторых вариантах осуществления четыре концевых U из SEQ ID NO: 171 отсутствуют. В некоторых вариантах осуществления присутствуют только 1, 2 или 3 из четырех концевых U последовательности SEQ ID NO: 171.

[00293] В некоторых вариантах осуществления онРНК содержит любую из направляющих последовательностей SEQ ID No: 1-101 и дополнительные нуклеотиды для образования crРНК, например, со следующей типовой каркасной последовательностью нуклеотидов, следующей за направляющей последовательностью на ее 3'-конце: GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGGCACCGAGUCGGUGC (SEQ ID NO: 173) в ориентации от 5' до 3'. SEQ ID NO: 173 отсутствуют 8 нуклеотидов со ссылкой на консервативную последовательность РНК-направляемой дикого типа: GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGC (SEQ ID NO: 172).

[00294] Другие иллюстративные каркасные нуклеотидные последовательности представлены в Таблице 23. В некоторых вариантах осуществления онРНК содержит любую из указанных направляющих последовательностей SEQ ID NO: 1-101 и дополнительные направляющие каркасные последовательности с 5'-3'-ориентацией в Таблице 23 включая модифицированные версии последовательностей каркаса, как продемонстрировано.

[00295] РНК-направляемая может дополнительно содержать trРНК. В каждом воплощении композиции и способа, описанных в настоящем документе, crРНК и trРНК могут быть связаны как одиночная РНК (онРНК) или могут находиться на отдельных РНК (днРНК). В контексте онРНК компоненты crРНК и trРНК могут быть ковалентно связаны, например, посредством фосфодиэфирной связи или другой ковалентной связи. В некоторых вариантах осуществления последовательность crРНК и/или trРНК может называться «каркасом» или «консервативной частью» направляющей РНК.

[00296] В каждом из вариантов осуществления композиции, применения и способа, описанных в настоящем документе, направляющая РНК может содержать две молекулы РНК в качестве «двойной направляющей РНК» или «днРНК». днРНК содержит первую молекулу РНК, содержащую crРНК, содержащую, *например*, направляющую последовательность, показанную в **Таблице 1**, и вторую молекулу РНК, содержащую trРНК. Молекулы первой и второй РНК могут не быть ковалентно связаны, но могут образовывать дуплекс РНК за счет спаривания оснований между частями crРНК и trРНК.

[00297] В каждом из вариантов композиции, применений и способа, описанных в настоящем документе, направляющая РНК может содержать одну молекулу РНК в качестве «одиночной направляющей РНК» или «онРНК». онРНК может содержать crРНК (или ее часть), содержащую направляющую последовательность, показанную в **Таблице 1**, ковалентно связанную с trРНК. онРНК может содержать 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов направляющей последовательности, показанной в **Таблице 1**. В некоторых вариантах осуществления crРНК и trРНК ковалентно связаны через линкер. В некоторых вариантах осуществления онРНК образует стержне-петлевую структуру за счет спаривания оснований между частями crРНК и trРНК. В некоторых вариантах осуществления crРНК и trРНК ковалентно связаны посредством одной или большего количества связей, которые не являются фосфодиэфирной связью.

[00298] В некоторых вариантах осуществления trРНК может содержать всю или часть последовательности trРНК, полученной из природной системы CRISPR/Cas. В некоторых вариантах осуществления trРНК содержит укороченную или модифицированную trРНК дикого типа. Длина trРНК зависит от применяемой системы CRISPR/Cas. В некоторых вариантах осуществления trРНК содержит или состоит из 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 или более 100 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления trРНК может содержать определенные вторичные структуры, такие как, например, одну или большее количество структур шпильки или стержне-петлевой, или одну или большее количество структур выпуклости.

[00299] В некоторых вариантах осуществления предлагается композиция, содержащая одну или большее количество направляющих РНК, содержащих направляющую последовательность, любую из предложенных в **Таблице 1**. В некоторых вариантах осуществления предлагается композиция, содержащая одну или более направляющих РНК, содержащих направляющую последовательность, любую из

предложенных в **Таблице 1**, где нуклеотиды SEQ ID NO: 170, 171, 172 или 173 следуют за направляющей последовательностью на ее 3'-конце. В некоторых вариантах осуществления одна или большее количество РНК-направляемых, содержащих направляющую последовательность, любую из предложенных в **Таблице 1**, где нуклеотиды SEQ ID NO: 170, 171, 172 или 173 следуют за направляющей последовательностью на ее 3'-конце, модифицированы в соответствии со схемой модификации SEQ ID NO: 300.

[00300] В некоторых вариантах осуществления предлагается композиция, содержащая одну или большее количество направляющих РНК, содержащих направляющую последовательность, любую из предложенных в **Таблице 1**. В одном аспекте предлагается композиция, содержащая одну или большее количество нРНК, содержащая направляющую последовательность, составляющую по меньшей мере 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91% или на 90% идентична любой из нуклеиновых кислот SEQ ID NO: 1-101.

[00301] В других вариантах осуществления предлагается композиция, которая содержит по меньшей мере одну, например, по меньшей мере две нРНК, содержащие направляющие последовательности, выбранные из любых двух или большего количества направляющих последовательностей, продемонстрированных в **Таблице 1**. В некоторых вариантах осуществления композиция содержит по меньшей мере две нРНК, каждая из которых содержит направляющую последовательность, идентичную по меньшей мере на 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91% или 90% любой из направляющих последовательностей, продемонстрированных в **Таблице 1**.

[00302] В некоторых вариантах осуществления композиции направляющей РНК по настоящему изобретению предназначены для распознавания (*например*, гибридизации) целевой последовательности в CIITA. Например, целевая последовательность CIITA может распознаваться и расщепляться предложенной клевазой Cas, содержащей направляющую РНК. В некоторых вариантах осуществления РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, такой как клеаваза Cas, может направляться направляющей РНК к целевой последовательности в CIITA, где направляющая последовательность направляющей РНК гибридизуется с целевой последовательностью и РНК-направляемым ДНК-связывающим агентом, таким как клеваза Cas, который расщепляет целевую последовательность.

[00303] В некоторых вариантах осуществления выбор одной или более направляющей РНК определяется на основе целевых последовательностей в CIITA. В некоторых вариантах осуществления композиции, содержащие одну или большее количество направляющих последовательностей, содержат направляющую последовательность, комплементарную соответствующей геномной области, продемонстрированной в **Таблице 1**, в соответствии с координатами эталонного генома человека hg38. Направляющие последовательности дополнительных вариантов осуществления могут быть комплементарны последовательностям в непосредственной

близости геномных координат, указанных в **Таблице 1**в пределах CIITA. Например, направляющие последовательности дополнительных вариантов осуществления могут быть комплементарны последовательностям, которые содержат 10 смежных нуклеотидов ± 10 нуклеотидов геномных координат, указанных в **Таблице 1**.

[00304] Не ограничиваясь какой-либо конкретной теорией, модификацией (например, мутации со сдвигом рамки считывания, возникающие в результате инделей, возникающих в результате опосредованного нуклеазой DSB) в определенных областях целевого гена могут быть менее переносимыми, чем мутации в других областях, таким образом, расположение DSB является важным фактором в количестве или типе нокдауна белка, который может возникнуть. В некоторых вариантах осуществления нРНК, комплементарная или имеющая комплементарность к целевой последовательности в целевом гене, используется для направления РНК-направляемого ДНК-связывающего агента в конкретное место в целевой гене.

[00305] В некоторых вариантах осуществления направляющая последовательность по меньшей мере на 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91%, 90%, 85% или 80% идентична целевой последовательности, присутствующей в целевом гене. В некоторых вариантах осуществления направляющая последовательность по меньшей мере на 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91%, 90%, 85% или 80% идентична целевой последовательности, присутствующей в гене CIITA человека.

[00306] В некоторых вариантах осуществления целевая последовательность может быть комплементарной направляющей последовательности направляющей РНК. В некоторых вариантах осуществления степень комплементарности или идентичности между направляющей последовательностью направляющей РНК и соответствующей целевой последовательностью может составлять по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, или 100%. В некоторых вариантах осуществления целевая последовательность и направляющая последовательность нРНК могут быть на 100% комплементарными или идентичными. В других вариантах осуществления целевая последовательность и направляющая последовательность нРНК могут содержать по меньшей мере одно несовпадение. Например, целевая последовательность и направляющая последовательность нРНК могут содержать 1, 2, 3 или 4 несовпадения, где общая длина направляющей последовательности составляет 20. В некоторых вариантах осуществления целевая последовательность и направляющая последовательность нРНК могут содержать 1-4 несовпадения, где направляющая последовательность составляет 20 нуклеотидов.

[00307] В некоторых вариантах осуществления композиция или состав, описанные в данном документе, содержат мРНК, содержащую открытую рамку считывания (ORF), кодирующую РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, такой как нуклеаза Cas, как описано в данном документе. В некоторых вариантах осуществления предлагается, применяется или вводится мРНК, содержащая ОРС, кодирующая РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, такой как Cas нуклеаза.

Модификации нРНК

[00308] В некоторых вариантах осуществления нРНК (например, онРНК, короткая онРНК, днРНК или crРНК) модифицирована. Термин «модифицированный» или «модификация» в контексте нРНК, описанной в настоящем документе, включает модификации, описанные выше, в том числе, например, (a) концевые модификации, например, 5'-концевые модификации или 3'-концевые модификации, включая 5'-концевые модификации. или модификации 3'-защитного конца, (b) модификации нуклеиновых оснований (или «оснований»), включая замену или удаление оснований, (c) модификации сахаров, включая модификации в положениях 2', 3' и/или 4', (d) модификации межнуклеозидных связей и (e) модификации основной цепи, которые могут включать модификацию или замену фосфодиэфирных связей и/или сахара рибозы. Модификация нуклеотида в данном положении включает модификацию или замену фосфодиэфирной связи непосредственно у 3'-конца сахара нуклеотида. Так, например, считается, что нуклеиновая кислота, содержащая фосфоротиоат между первым и вторым сахарами с 5'-конца, содержит модификацию в положении 1. Термин «модифицированная нРНК» обычно относится к нРНК, имеющей модификацию химической структуры одного или большего количества из основания, сахара и фосфодиэфирной связи или частей скелета, включая нуклеотидфосфаты, как подробно и проиллюстрировано в настоящем документе.

[00309] Дальнейшее описание и примеры модификаций предложены в Таблице 1 документа WO 2019/237069, опубликованного 12 декабря 2019 г., полное содержание которого включено в настоящий документ в качестве ссылки.

[00310] В некоторых вариантах осуществления нРНК содержит модификации в 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 или большего количества YA-сайтов. В некоторых вариантах осуществления пиримидин YA-сайта содержит модификацию (которая включает модификацию, изменяющую межнуклеозидную связь непосредственно с 3’-конца сахара пиримидина). В некоторых вариантах осуществления аденин YA-сайта содержит модификацию (которая включает модификацию, изменяющую межнуклеозидную связь непосредственно с 3’-конца сахара аденина). В некоторых вариантах осуществления пиримидин и аденин YA-сайта содержат модификации, такие как модификации сахара, основания или межнуклеозидной связи. YA-модификации могут представлять собой модификации любого из типов, приведенных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления YA-модификации содержат один или большее количество из фосфоротиоата, 2’-OMe или 2’-фтор. В некоторых вариантах осуществления YA-модификации включают модификации пиримидина, включающие один или большее количество из фосфоротиоата, 2’-OMe, 2’-H, инозина или 2’-фтора. В некоторых вариантах осуществления YA-модификация содержит бициклический аналог рибозы (например, LNA, BNA или ENA) в области дуплекса РНК, которая содержит один или большее количество YA-сайтов. В некоторых вариантах осуществления YA-модификация содержит аналог бициклической рибозы (например, LNA, BNA или ENA) в области дуплекса РНК, которая содержит YA-сайт, где YA-модификация расположена

дистальнее YA-сайта.

[00311] В некоторых вариантах осуществления направляющая последовательность (или направляющая область) нРНК содержит 1, 2, 3, 4, 5 или большее количество YA-сайтов («YA-сайты направляющей области»), которые могут содержать YA-модификации. В некоторых вариантах осуществления один или большее количество YA-сайтов, расположенных на 5-конце, 6-конце, 7-конце, 8-конце, 9-конце или 10-конце от 5'-конца 5'-конца (где «5-конец» и т. д., относится к положению 5 к 3'-концу направляющей области, т. е. самому 3'-нуклеотиду в направляющей области) содержат YA-модификации. Модифицированный YA-сайт направляющей области содержит YA-модификацию.

[00312] В некоторых вариантах осуществления YA-сайт модифицированной направляющей области находится в пределах 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10 или 9 нуклеотидов от 3'-концевого нуклеотида направляющей области. Например, если YA-сайт модифицированной направляющей области находится в пределах 10 нуклеотидов от 3'-концевого нуклеотида направляющей области, а длина направляющей области составляет 20 нуклеотидов, то модифицированный нуклеотид YA-сайта модифицированной направляющей области расположен в любом из положений 11-20. В некоторых вариантах осуществления YA-сайт модифицированной направляющей области находится на нуклеотиде 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или 11 от 5'-конца 5'-конца или после него.

[00313] В некоторых вариантах осуществления YA-сайт модифицированной направляющей области отличается от модификации 5'-конца. Например, онРНК может содержать модификацию 5'-конца, как описано в настоящем документе, и дополнительно содержать YA-сайт модифицированной направляющей области. Альтернативно, онРНК может содержать немодифицированный 5'-конец и YA-сайт модифицированной направляющей области. Альтернативно, короткая онРНК может содержать модифицированный 5'-конец и немодифицированный YA-сайт модифицированной направляющей области.

[00314] В некоторых вариантах осуществления YA-сайт модифицированной направляющей области содержит модификацию, которую не содержит по меньшей мере один нуклеотид, расположенный на 5'-конце YA-сайта направляющей области. Например, если нуклеотиды 1-3 содержат фосфоротиоаты, нуклеотид 4 содержит только модификацию 2'-OMe, а нуклеотид 5 представляет собой пиримидин YA-сайта и содержит фосфоротиоат, то YA-сайт модифицированной направляющей области содержит модификацию (фосфотиоат) что по меньшей мере один нуклеотид, расположенный на 5'-конце YA-сайта направляющей области (нуклеотид 4), не содержит. В другом примере, если нуклеотиды 1-3 содержат фосфоротиоаты, а нуклеотид 4 представляет собой пиримидин YA-сайта и содержит 2'-OMe, то YA-сайт модифицированной направляющей области содержит модификацию (2'-OMe), в которой по меньшей мере один нуклеотид, расположенный 5' от YA-сайта направляющей области (любой из нуклеотидов 1-3), не содержит. Это условие также всегда выполняется, если немодифицированный нуклеотид расположен на 5'-конце YA-сайта модифицированной направляющей области.

[00315] В некоторых вариантах осуществления YA-сайт модифицированной направляющей области содержат модификации, как описано выше для YA-сайтов. Направляющая область нРНК может быть модифицирована в соответствии с любым вариантом осуществления , содержащим модифицированную направляющую область, приведенную в настоящем документе. Любые варианты осуществления , приведенные в другом месте в этом описании, могут быть объединены, насколько это возможно, с любым из предыдущих вариантов осуществления.

[00316] В некоторых вариантах осуществления модифицированы 5’- и/или 3’-концевые области нРНК.

[00317] В некоторых вариантах осуществления модифицированы концевые (т.е. последние) 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7 нуклеотидов в 3'-концевой области. В дальнейшем эта модификация может называться «модификацией 3’-конца». В некоторых вариантах осуществления модифицированы концевые (т.е. последние) 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7 нуклеотидов в 3'-концевой области содержат более одной модификации. В некоторых вариантах осуществления модификация 3'-конца содержит или дополнительно содержит любое одно или большее количество следующего: модифицированный нуклеотид, выбранный из 2'-O-метил (2'-O-Me) модифицированного нуклеотида, 2'-O-(2 - метоксиэтил) (2'-O-moe) модифицированный нуклеотид, 2'-фтор (2'-F) модифицированный нуклеотид, фосфоротиоатная (PS) связь между нуклеотидами, инвертированный базовый модифицированный нуклеотид или их комбинации. В некоторых вариантах осуществления модификация 3’-конца включает или дополнительно включает модификации 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7 нуклеотидов на 3’-конце нРНК. В некоторых вариантах осуществления модификация 3’-конца содержит или дополнительно содержит одну связь PS, где связь находится между последним и предпоследним нуклеотидом. В некоторых вариантах осуществления модификация 3’-конца содержит или дополнительно содержит две связи PS между последними тремя нуклеотидами. В некоторых вариантах осуществления модификация 3’-конца содержит или дополнительно содержит четыре связи PS между последними четырьмя нуклеотидами. В некоторых вариантах осуществления модификация 3’-конца содержит или дополнительно содержит связи PS между любым одним или большим количеством из последних 2, 3, 4, 5, 6 или 7 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления нРНК, содержащая модификацию 3'-конца, содержит или дополнительно содержит 3'-хвост, где 3'-хвост содержит модификацию любого одного или большего количества нуклеотидов, присутствующих в 3'-хвосте. В некоторых вариантах осуществления 3’-хвост полностью модифицирован. В некоторых вариантах осуществления 3'-хвост содержит 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 1-2, 1-3, 1-4, 1-5, 1-6, 1 -7, 1-8, 1-9 или 1-10 нуклеотидов, необязательно, где любой один или большее количество из этих нуклеотидов модифицированы. В некоторых вариантах осуществления предлагается нРНК, содержащая модификацию 3’-защитного конца. В некоторых вариантах осуществления 3'-хвост содержит от 1 до около 20 нуклеотидов, от 1 до около 15 нуклеотидов, от 1 до около 10 нуклеотидов, от 1 до около 5 нуклеотидов, от 1

до около 4 нуклеотидов, от 1 до около 3 нуклеотидов и от 1 до около 2 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления нРНК не содержит 3’-хвост.

[00318] В некоторых вариантах осуществления модифицирована 5'-концевая область, например, модифицированы первые 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7 нуклеотидов нРНК. В дальнейшем эта модификация может называться «модификацией 5’-конца». В некоторых вариантах осуществления первые 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7 нуклеотидов 5'-концевой области содержат более одной модификации. В некоторых вариантах осуществления модифицирован по меньшей мере один из концевых (т. е. первых) 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7 нуклеотидов на 5’-конце. В некоторых вариантах осуществления модифицированы как 5’-, так и 3’-концевые области (например, концы) нРНК. В некоторых вариантах осуществления модифицирована только 5'-концевая область нРНК. В некоторых вариантах осуществления модифицирована только 3'-концевая область (плюс или минус 3'-хвост) консервативной части нРНК. В некоторых вариантах осуществления нРНК содержит модификации в 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7 из первых 7 нуклеотидов в 5'-концевой области нРНК. В некоторых вариантах осуществления нРНК содержит модификации 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7 из 7 концевых нуклеотидов в 3'-концевой области. В некоторых вариантах осуществления модифицированы 2, 3 или 4 из первых 4 нуклеотидов в 5'-концевой области и/или 2, 3 или 4 из 4 концевых нуклеотидов в 3'-концевой области. В некоторых вариантах осуществления 2, 3 или 4 из первых 4 нуклеотидов в 5'-концевой области связаны фосфоротиоатными (PS) связями. В некоторых вариантах осуществления модификация 5'-конца и/или 3'-конца включает 2'-O-метил (2'-O-Me) или 2'-O-(2-метоксиэтил) (2'-O-Moe) модификация. В некоторых вариантах осуществления модификация включает 2’-фтор (2’-F) модификацию нуклеотида. В некоторых вариантах осуществления модификация включает фосфоротиоатную (PS) связь между нуклеотидами. В некоторых вариантах осуществления модификация включает инвертированный нуклеотид нуклеотида. В некоторых вариантах осуществления модификация включает модификацию защитного конца. В некоторых вариантах осуществления модификация включает более одной модификации, выбранной из модификации защитного конца, 2'-O-Me, 2'-O-moe, 2'-фтор (2'-F), тиофосфатной (PS) связи между нуклеотидов и инвертированный нуклеотид. В некоторых вариантах осуществления охватывается эквивалентная модификация.

[00319] В некоторых вариантах осуществления предлагается нРНК, содержащая модификацию 5’-конца и модификацию 3’-конца. В некоторых вариантах осуществления нРНК содержит модифицированные нуклеотиды, которые не находятся на 5’- или 3’-концах.

[00320] В некоторых вариантах осуществления предлагается онРНК, содержащая модификацию верхнего стержня, где модификация верхнего стержня включает модификацию любого одного или большего количества из US1-US12 в области верхнего стержня. В некоторых вариантах осуществления предлагается онРНК, содержащая модификацию верхнего стержня, где модификация верхнего стержня включает

модификацию по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или всех 12 нуклеотидов в верхней части стебля. В некоторых вариантах осуществления предлагается онРНК, содержащая модификацию верхнего стержня, где модификация верхнего стержня включает 1, 2, 3, 4 или 5 YA-модификаций в YA-сайте. В некоторых вариантах осуществления модификация верхнего стержня содержит модифицированный нуклеотид 2'-OMe, модифицированный нуклеотид 2'-O-moe, модифицированный нуклеотид 2'-F и/или их комбинации. Другие модификации, описанные в настоящем документе, такие как модификация 5'-конца и/или модификация 3'-конца, могут быть объединены с модификацией верхнего стержня.

[00321] В некоторых вариантах осуществления онРНК содержит модификацию в области шпильки. В некоторых вариантах осуществления модификация шпилечного участка включает по меньшей мере один модифицированный нуклеотид, выбранный из 2'-O-метил (2'-OMe) модифицированного нуклеотида, 2'-фтор (2'-F) модифицированного нуклеотида и/или их комбинаций. В некоторых вариантах осуществления модификация области шпильки находится в области шпильки 1. В некоторых вариантах осуществления модификация области шпильки находится в области шпильки 2. В некоторых вариантах осуществления модификация шпильки содержит 1, 2 или 3 YA-модификации в YA-сайте. В некоторых вариантах осуществления модификация шпильки включает по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5 или 6 YA-модификаций. Другие модификации, описанные в настоящем документе, такие как модификация верхней части стержня, модификация 5'-конца и/или модификация 3'-конца, могут быть объединены с модификацией в области шпильки.

[00322] В некоторых вариантах осуществления нРНК содержит замещенную и необязательно укороченную область шпильки 1, где по меньшей мере одна из следующих пар нуклеотидов заменена в замещенной и необязательно укороченной шпильке 1 нуклеотидами спаривания Уотсона-Крика: H1-1 и H1-12, H1-2 и H1-11, H1-3 и H1-10 и/или H1-4 и H1-9. «Парные нуклеотиды Уотсона-Крика» включают любую пару, способную образовывать пару оснований Уотсона-Крика, включая пары A-T, A-U, T-A, U-A, C-G и G-C, а также пары, включающие модифицированные версии любого из вышеуказанных нуклеотидов, которые имеют одинаковые предпочтения в паре оснований. В некоторых вариантах осуществления в области шпильки 1 отсутствуют какие-либо один или два из H1-5-H1-8. В некоторых вариантах осуществления в области шпильки 1 отсутствуют одна, две или три из следующих пар нуклеотидов: H1-1 и H1-12, H1-2 и H1-11, H1-3 и H1-10 и/или H1- 4 и H1-9. В некоторых вариантах осуществления в области шпильки 1 отсутствуют 1-8 нуклеотидов области шпильки 1. В любом из приведенных выше вариантов осуществления отсутствующие нуклеотиды могут быть такими, что одна или большее количество пар нуклеотидов заменены парами нуклеотидов Уотсона-Крика (H1-1 и H1-12, H1-2 и H1-11, H1-3 и H1- 10, и/или H1-4 и H1-9) образуют пару оснований в нРНК.

[00323] В некоторых вариантах осуществления нРНК дополнительно содержит участок верхнего стержня, в котором отсутствует по меньшей мере 1 нуклеотид,

например, любой из укороченных участков верхнего стержня, указанных в Таблице 7 заявки США № 62/946905, содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки целиком или описанные в другом месте в данном документе, которые могут быть объединены с любой из укороченных или замещенных областей шпильки 1, описанных в данном документе.

[00324] В некоторых вариантах осуществления нРНК, описанная в настоящем документе, дополнительно содержит нексусную область, где в нексусной области отсутствует по меньшей мере один нуклеотид.

[00325] В некоторых вариантах осуществления онРНК, предложенная в настоящем документе, представляет собой короткую одиночную направляющую РНК (короткие онРНК), например, содержащую консервативную часть онРНК, содержащую область шпильки, где в области шпильки отсутствует по меньшей мере 5-10 нуклеотидов или 6-10 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления 5-10 нуклеотидов или 6-10 нуклеотидов являются смежными.

[00326] В некоторых вариантах осуществления в короткой онРНК отсутствуют по меньшей мере нуклеотиды 54-58 (AAAAA) консервативной части онРНК spyCas9. В некоторых вариантах осуществления короткая онРНК представляет собой онРНК, не относящуюся к spyCas9, в которой отсутствуют нуклеотиды, соответствующие нуклеотидам 54-58 (AAAAA) консервативной части spyCas9, как определено, например, путем парного или структурного выравнивания.

[00327] В некоторых вариантах осуществления короткая онРНК, описанная в настоящем документе, содержит консервативную часть, содержащую область шпильки, где в области шпильки отсутствуют 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления недостающие нуклеотиды составляют 5-10 недостающих нуклеотидов или 6-10 недостающих нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления недостающие нуклеотиды расположены последовательно. В некоторых вариантах осуществления недостающие нуклеотиды охватывают по меньшей мере часть шпильки 1 и часть шпильки 2. В некоторых вариантах осуществления недостающие 5-10 нуклеотидов включают или состоят из нуклеотидов 54-58, 54-61 или 53-60 SEQ ID NO: 171.

[00328] В некоторых вариантах осуществления короткая онРНК, описанная в настоящем документе, дополнительно содержит нексусную область, где в нексусной области отсутствует по меньшей мере один нуклеотид (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 нуклеотидов в нексусная область). В некоторых вариантах осуществления у короткой онРНК отсутствует каждый нуклеотид в нексусной области.

[00329] В некоторых вариантах осуществления описанная в настоящем документе короткая онРНК SpyCas9 содержит последовательность NNNNNNNNNNNNNNNNNNNGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCACGAAAGGGCACCGAGUCGGUGCU (SEQ ID NO: 976).

[00330] В некоторых вариантах осуществления короткая онРНК, описанная в

настоящем документе, содержит паттерн модификации, показанный в SEQ ID NO: 977: mN*mN*mN*NNNNNNNNNNNNNNNNNGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUm AmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCACGAAAGGGCACCGAGUCGGmU mGmC*mU (SEQ ID NO: 977), где A, C, G, U и N представляет собой аденин, цитозин, гуанин, урацил и любой рибонуклеотид соответственно, если в контексте не указано иное. Символ m указывает на модификацию 2'O-метила, а * указывает на фосфоротиоатную связь между нуклеотидами.

[00331] В некоторых вариантах осуществления , применяя SEQ ID NO: 172 («Типовая онРНК-1 SpyCas9») в качестве примера, Типовая онРНК-1 SpyCas9 дополнительно включает одно или большее количество из:

A. укороченная область шпильки 1 или замещенная и необязательно укороченная область шпильки 1, где

1. хотя бы одна из следующих пар нуклеотидов заменена в шпильке 1 парами нуклеотидов Уотсона-Крика: H1-1 и H1-12, H1-2 и H1-11, H1-3 и H1-10 или H1- 4 и H1-9, а область шпильки 1 необязательно отсутствует

a. любой один или два из H1-5 до H1-8,

b. одна, две или три из следующих пар нуклеотидов: H1-1 и H1-12, H1-2 и H1-11, H1-3 и H1-10, H1-4 и H1-9, или

c. 1-8 нуклеотидов шпильки 1 области; или

2. в укороченной шпильке 1 отсутствует 6-8 нуклеотидов, предпочтительно 6 нуклеотидов; и

a. одно или большее количество положений H1-1, H1-2 или H1-3 делетированы или заменены по сравнению с Типовой онРНК-1 SpyCas9 (SEQ ID NO: 172), или

b. одно или большее количество положений с H1-6 по H1-10 заменены по сравнению с Типовой онРНК-1 SpyCas9 (SEQ ID NO: 172); или

3. в области укороченной шпильки 1 отсутствуют 5-10 нуклеотидов, предпочтительно 5-6 нуклеотидов, и одно или большее количество положений N18, H1-12 или n заменены по сравнению с Типовой онРНК-1 SpyCas9 (SEQ ID NO: 172); или

B. укороченный участок верхнего стержня, где в укороченном участке верхнего стержня отсутствуют 1-6 нуклеотидов и где 6, 7, 8, 9, 10 или 11 нуклеотидов укороченного участка верхнего стержня включают меньше или равно 4 относительных замен к типовой онРНК-1 SpyCas9 (SEQ ID NO: 172); или

C. замену относительно типовой онРНК-1 SpyCas9 (SEQ ID NO: 172) в любом одном или большего количества из LS6, LS7, US3, US10, B3, N7, N15, N17, H2-2 и H2-14, где замещающий нуклеотид не является ни пиримидином, за которым следует аденин, ни аденином, которому предшествует пиримидин; или

D. Типовая онРНК-1 SpyCas9 (SEQ ID NO: 172) с верхней областью стержня, где модификация верхнего стержня включает модификацию любого одного или большего количества US1-US12 в верхней области стержня, где

1. модифицированный нуклеотид необязательно выбирают из 2'-O-метил (2'-OMe)

модифицированного нуклеотида, 2'-O-(2-метоксиэтил) (2'-O-moe) модифицированного нуклеотида, 2'-фтор-(2'-F) модифицированный нуклеотид, фосфоротиоатная (PS) связь между нуклеотидами, инвертированный базовый модифицированный нуклеотид или их комбинация; или

2. модифицированный нуклеотид необязательно включает модифицированный 2'-OMe нуклеотид.

[00332] В некоторых вариантах осуществления репрезентативная онРНК-1 SpyCas9 или онРНК, такая как онРНК, содержащая репрезентативную онРНК-1 SpyCas9, дополнительно включает 3'-хвост, например, 3'-хвост из 1, 2, 3, 4 или более нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления хвост включает один или большее количество модифицированных нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления модифицированный нуклеотид выбирают из 2'-O-метил (2'-OMe) модифицированного нуклеотида, 2'-O-(2-метоксиэтил) (2'-O-moe) модифицированного нуклеотида, 2' фтор-(2'-F) модифицированный нуклеотид, фосфоротиоатная (PS) связь между нуклеотидами, и инвертированный базовый модифицированный нуклеотид или их комбинация. В некоторых вариантах осуществления модифицированный нуклеотид включает модифицированный 2'-OMe нуклеотид. В некоторых вариантах осуществления модифицированный нуклеотид включает PS-связь между нуклеотидами. В некоторых вариантах осуществления модифицированный нуклеотид включает модифицированный 2'-OMe нуклеотид и PS-связь между нуклеотидами.

[00333] В некоторых вариантах осуществления нРНК химически модифицирована. нРНК, содержащая один или большее количество модифицированных нуклеозидов или нуклеотидов, называется «модифицированной» нРНК или «химически модифицированной» нРНК для описания присутствия одного или большего количества неприродных и/или природных компонентов или конфигураций, которые применяются вместо или в дополнение к каноническим остаткам A, G, C и U. Модифицированные нуклеозиды и нуклеотиды могут включать один или большее количество из: (i) изменение, *например*, замена одного или обоих не связывающих фосфатных атомов кислородов и/или одного или большего количества связывающих фосфатных атомов кислородов в фосфодиэфирной связи основной цепи (типовая модификация основной цепи); (ii) изменение, *например*, замена компонента рибозного сахара, *например*, 2'-гидроксила на рибозном сахаре (типовая модификация сахара); (iii) полная замена фосфатного фрагмента «дефосфо» линкерами (типовая модификация основной цепи); (iv) модификация или замена природного нуклеинового основания, в том числе неканоническим нуклеиновым основанием (типовая модификация основания); (v) замена или модификация рибозофосфатного остова (типовая модификация основной цепи); (vi) модификация 3'-конца или 5'-конца олигонуклеотида, *например*, удаление, модификация или замена концевой фосфатной группы или конъюгация фрагмента, крышки или линкера (такие модификации 3'- или 5'-крышки могут включать в себя модификацию сахара и/или основной цепи); и (vii) модификация или замена сахара (иллюстративная модификация

сахара).

[00334] Химические модификации, такие как перечисленные выше, могут быть объединены для получения модифицированных нРНК, содержащих нуклеозиды и нуклеотиды (все вместе именуемые «остатки»), которые могут иметь две, три, четыре или более модификаций. Например, модифицированный остаток может иметь модифицированный сахар и модифицированное азотистое основание. В некоторых вариантах осуществления каждое основание нРНК модифицировано, *например*, все основания имеют модифицированную фосфатную группу, такую как фосфоротиоатная группа. В определенных вариантах осуществления все или по существу все фосфатные группы молекулы нРНК заменены фосфоротиоатными группами. В некоторых вариантах осуществления модифицированные нРНК содержат по меньшей мере один модифицированный остаток на 5'-конце РНК или вблизи него. В некоторых вариантах осуществления модифицированные нРНК содержат по меньшей мере один модифицированный остаток на 3'-конце РНК или вблизи него.

[00335] В некоторых вариантах осуществления нРНК содержит один, два, три или большее количество модифицированных остатков. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 5% (*например*, по меньшей мере 5%, по меньшей мере 10%, по меньшей мере 15%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 25%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 35%, по меньшей мере 40% , по меньшей мере 45%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или 100%) положений в модифицированной нРНК представляют собой модифицированные нуклеозиды или нуклеотиды.

[00336] В некоторых вариантах осуществления модификации основной цепи фосфатная группа модифицированного остатка может быть модифицирована путем замены одного или большего количества атомов кислорода другим заместителем. Кроме того, модифицированный остаток, *например*, модифицированный остаток, присутствующий в модифицированной нуклеиновой кислоте, может включать полную замену немодифицированной фосфатной группы модифицированной фосфатной группой, как описано в данном документе. В некоторых вариантах осуществления модификация основной фосфатной цепи может включать изменения, которые приводят или к незаряженному линкеру, или к заряженному линкеру с несимметричным распределением заряда.

[00337] Примеры модифицированных фосфатных групп включают фосфоротиоат, фосфороселенаты, боранофосфаты, сложные фосфатные эфиры борана, гидрофосфонаты, фосфороамидаты, алкильные или арильные фосфонаты и сложные фосфотриэфиры.

[00338] Также могут быть сконструированы каркасы, которые могут имитировать нуклеиновые кислоты, в которых фосфатный линкер и рибозный сахар заменены устойчивыми к нуклеазе нуклеозидами или заменителями нуклеотидов. Такие модификации могут включать модификации скелета и сахара. В некоторых вариантах

осуществления азотистые основания могут быть связаны суррогатным остовом. Примеры могут включать, без ограничения, заменители нуклеозидов морфолино, циклобутил, пирролидин и пептидную нуклеиновую кислоту (PNA).

[00339] Модифицированные нуклеозиды и модифицированные нуклеотиды могут включать одну или большее количества модификаций сахарной группы, *т.е.* модификацию сахаров. Например, 2'-гидроксильная группа (OH) может быть модифицирована, *т.е.* заменены рядом различных «окси» или «дезокси» заместителей. В некоторых вариантах осуществления модификации 2'-гидроксильной группы могут повышать стабильность нуклеиновой кислоты, поскольку гидроксил больше не может депротонироваться с образованием 2'-алкоксид-иона. Примеры модификаций 2'-гидроксильной группы могут включать алкокси или арилокси (OR, где «R» может быть, *например*, алкилом, циклоалкилом, арилом, аралкилом, гетероарилом или сахаром); полиэтиленгликоли (ПЭГ), $O(CH_2CH_2O)_nCH_2CH_2OR$, где R может быть, *например*, H или необязательно замещенным алкилом, а n может быть целым числом от 0 до 20. В некоторых вариантах осуществления модификация 2'-гидроксильной группы может представлять собой 2'-O-Me. В некоторых вариантах осуществления модификация 2'-гидроксильной группы может представлять собой модификацию 2'-фтора, которая заменяет 2'-гидроксильную группу фторидом. В некоторых вариантах осуществления модификация 2'-гидроксильной группы может включать «закрытые» нуклеиновые кислоты (LNA), в которых 2'-гидроксил может быть соединен, *например*, с помощью C_{1-6} алкиленового или C_{1-6} гетероалкиленового мостика с 4'-углеродным мостиком того же рибозного сахара, где типичные мостики могут включать метиленовые, пропиленовые, эфирные или аминные мостики. В некоторых вариантах осуществления модификация 2'-гидроксильной группы может включать «незаблокированные» нуклеиновые кислоты (UNA), в которых в кольце рибозы отсутствует связь C2'-C3'. В некоторых вариантах осуществления модификация 2'-гидроксильной группы может включать метоксиэтильную группу (MOE), ($OCH_2CH_2OCH_3$, *например*, производное ПЭГ).

[00340] Модификации "дезокси" 2' могут включать водород (*т.е.* дезоксирибозные сахара, *например*, в выступающих частях частично дсРНК); галоген (*например*, бром, хлор, фтор или йод); амино (где амино может представлять собой, *например*, NH_2; алкиламино, диалкиламино, гетероциклил, ариламино, диариламино, гетероариламино, дигетероариламино или аминокислоту); $NH(CH_2CH_2NH)_nCH2CH_2$-амино (где амино может быть, *например*, таким, как описано в настоящем документе), -NHC(O)R (где R может быть, *например*, алкилом, циклоалкилом, арилом, аралкилом, гетероарилом или сахаром), циано; меркапто; алкилтиоалкил; тиоалкокси; и алкил, циклоалкил, арил, алкенил и алкинил, которые могут быть необязательно замещены, *например*, амино, как описано в настоящем документе.

[00341] Модификация сахара может включать сахарную группу, которая также может содержать один или большего количества атомов углерода, обладающих стереохимической конфигурацией, противоположной конфигурации соответствующего

углерода в рибозе. Таким образом, модифицированная нуклеиновая кислота может включать нуклеотиды, содержащие, *например*, арабинозу в качестве сахара. Модифицированные нуклеиновые кислоты могут также включать низкоосновные сахара. Эти низкоосновные сахара также могут быть дополнительно модифицированы по одному или большим количеством составляющим атомам сахара. Модифицированные нуклеиновые кислоты могут также включать один или большее количество сахаров в L форме, *например* L нуклеозиды.

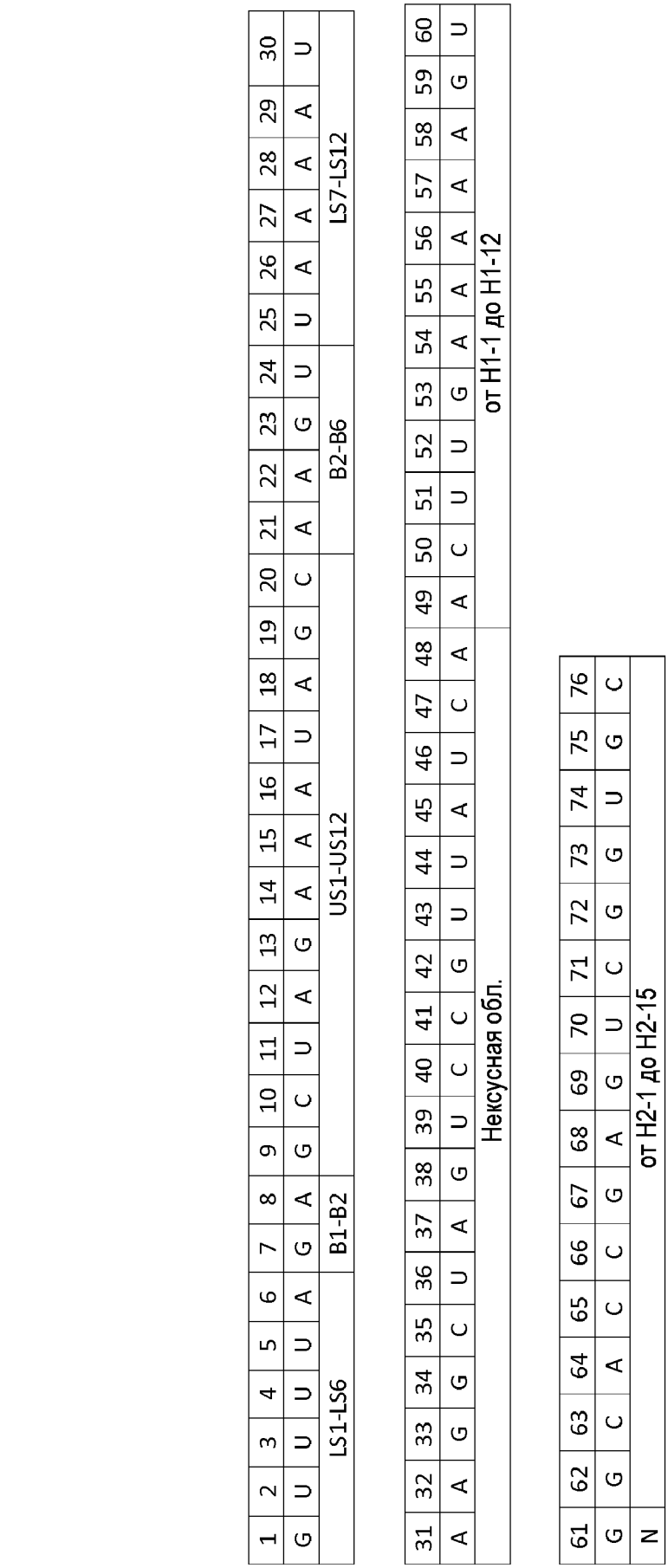
[00342] Описанные в настоящем документе модифицированные нуклеозиды и модифицированные нуклеотиды, которые могут быть включены в модифицированную нуклеиновую кислоту, могут включать модифицированное основание, также называемое нуклеооснованием. Примеры азотистых оснований включают, но не ограничиваются ими, аденин (A), гуанин (G), цитозин (C) и урацил (U). Эти азотистые основания могут быть модифицированы или полностью заменены для получения модифицированных остатков, которые могут быть включены в модифицированные нуклеиновые кислоты. Нуклеотидное основание нуклеотида может быть независимо выбрано из пурина, пиримидина, аналога пурина или аналога пиримидина. В некоторых вариантах осуществления азотистое основание может включать, например, встречающиеся в природе и синтетические производные основания.

[00343] В вариантах осуществления , применяющих двойную РНК-направляемую, каждая из crРНК и tracr РНК может содержать модификации. Такие модификации могут быть на одном или обоих концах crРНК и/или tracr РНК. В вариантах осуществления , содержащих онРНК, один или большее количество остатков на одном или обоих концах онРНК могут быть химически модифицированы, или вся онРНК может быть химически модифицирована. Некоторые варианты осуществления включают модификацию 5'-конца. Некоторые варианты осуществления включают модификацию 3'-конца. В некоторых вариантах осуществления один или большее количество или все нуклеотиды в выступающем одноцепочечном выступе молекулы нРНК представляют собой дезоксинуклеотиды.

[00344] В некоторых вариантах осуществления нРНК, описанные в настоящем документе, содержат один из паттернов модификации, описанных в WO2018/107028 A1, опубликованной 14 июня 2018 г., содержание которой полностью включено в настоящий документ посредством ссылки.

[00345] Термины «mA», «mC», «mU» или «mG» могут использоваться для обозначения нуклеотида, модифицированного 2’-O-Me. Термины «fA», «fC», «fU» или «fG» могут использоваться для обозначения нуклеотида, который был заменен на 2’-F. «*» может использоваться для обозначения модификации ФТ. Термины A*, C*, U* или G* могут использоваться для обозначения нуклеотида, который связан со следующим (например, 3’) нуклеотидом PS-связью. Термины «mA*», «mC*», «mU*» или «mG*» могут использоваться для обозначения нуклеотида, который был заменен на 2'-O-Me и который связан со следующим (например, 3') нуклеотид со PS-связью.

[00346] Типичная онРНК-1 spyCas9 (SEQ ID NO: 172)



[00347]

Рибонуклеопротеиновый комплекс

[00348] В некоторых вариантах осуществления предлагаются композиции, содержащие одну или большее количество нРНК, содержащих одну или большее количество направляющих последовательностей из **Таблицы 1**, и РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, например, нуклеазу, такую как нуклеаза Cas, такая как Cas9. В некоторых вариантах осуществления РНК-направляемый ДНК-связывающий агент обладает клевазной активностью, которая также может упоминаться как двухцепочечная эндонуклеазная активность. В некоторых вариантах осуществления РНК-направляемый ДНК-связывающий агент содержит нуклеазу Cas. Примеры нуклеаз Cas9 включают в себя системы CRISPR типа II S. pyogenes, S. aureus и других прокариот (*см., например*, список в следующем абзаце), а также их модифицированные (*например*, сконструированные или мутантные) версии. *См., например*, US 2016/0312198 A1; US 2016/0312199 A1. Другие примеры нуклеаз Cas включают комплекс Csm или Cmr системы CRISPR типа III или ее субъединицу Cas10, Csm1 или Cmr2; и комплекс Cascade системы CRISPR типа I или ее субъединицу Cas3. В некоторых вариантах осуществления нуклеаза Cas может происходить из системы типа IIA, типа IIB или типа IIC. Для обсуждения различных систем CRISPR и нуклеаз Cas см., например, Makarova et al., NAT. REV. MICROBIOL. 9:467-477 (2011); Makarova et al., NAT. REV. MICROBIOL, 13: 722-36 (2015); Shmakov et al., MOLECULAR CELL, 60:385-397 (2015). В некоторых вариантах осуществления РНК-направляемый ДНК-связывающий агент содержит никазу Cas. В некоторых вариантах осуществления РНК-направляемая никаза модифицирована или получена из белка Cas, такого как нуклеаза Cas класса 2 (которая может представлять собой, например, нуклеазу Cas типа II, V или VI). Нуклеаза Cas класса 2 включает, например, белки Cas9, Cpf1, C2c1, C2c2 и C2c3, и их модификации.

[00349] Неограничивающие примеры видов, из которых может быть получена нуклеаза Cas или никаза Cas, включают Streptococcus pyogenes, Streptococcus thermophilus, Streptococcus sp., Staphylococcus aureus, Listeria innocua, Lactobacillus gasseri, Francisella novicida, Wolinella succinogenes, Sutterella wadsworthensis, Gammaproteobacterium, Neisseria meningitidis, Campylobacter jejuni, Pasteurella multocida, Fibrobacter succinogene, Rhodospirillum rubrum, Nocardiopsis dassonvillei, Streptomyces pristinaespiralis, Streptomyces viridochromogenes, Streptomyces viridochromogenes, Streptosporangium roseum, Streptosporangium roseum, Alicyclobacillus acidocaldarius, Bacillus pseudomycoides, Bacillus selenitireducens, Exiguobacterium sibiricum, Lactobacillus delbrueckii, Lactobacillus salivarius, Lactobacillus buchneri, Treponema denticola, Microscilla marina, Burkholderiales bacterium, Polaromonas naphthalenivorans, Polaromonas sp., Crocosphaera watsonii, Cyanothece sp., Microcystis aeruginosa, Synechococcus sp., Acetohalobium arabaticum, Ammonifex degensii, Caldicelulosiruptor becscii, Candidatus Desulforudis, Clostridium botulinum, Clostridium difficile, Finegoldia magna, Natranaerobius thermophilus, Pelotomaculum thermopropionicum, Acidithiobacillus caldus, Acidithiobacillus ferrooxidans,

Allochromatium vinosum, Marinobacter sp., Nitrosococcus halophilus, Nitrosococcus watsoni, Pseudoalteromonas haloplanktis, Ktedonobacter racemifer, Methanohalobium evestigatum, Anabaena variabilis, Nodularia spumigena, Nostoc sp., Arthrospira maxima, Arthrospira platensis, Arthrospira sp., Lyngbya sp., Microcoleus chthonoplastes, Oscillatoria sp., Petrotoga mobilis, Thermosipho africanus, Streptococcus pasteurianus, Neisseria cinerea, Campylobacter lari, Parvibaculum lavamentivorans, Corynebacterium diphtheria, Acidaminococcus sp., Lachnospiraceae bacterium ND2006 и Acaryochloris marina.

[00350] В некоторых вариантах осуществления нуклеаза Cas представляет собой нуклеазу Cas9 из Streptococcus pyogenes. В некоторых вариантах осуществления нуклеаза Cas представляет собой нуклеазу Cas9 из Streptococcus thermophilus. В некоторых вариантах осуществления нуклеаза Cas представляет собой нуклеазу Cas9 из Neisseria meningitidis. В некоторых вариантах осуществления нуклеаза Cas представляет собой нуклеазу Cas9 из Staphylococcus aureus. В некоторых вариантах осуществления нуклеаза Cas представляет собой нуклеазу Cpf1 из Francisella novicida. В некоторых вариантах осуществления нуклеаза Cas представляет собой нуклеазу Cpf1 из Acidaminococcus sp. В некоторых вариантах осуществления нуклеаза Cas представляет собой нуклеазу Cpf1 из Lachnospiraceae bacterium ND2006. В дополнительных вариантах осуществления нуклеаза Cas представляет собой нуклеазу Cpf1 из Francisella tularensis, Lachnospiraceae bacterium, Butyrivibrio proteoclasticus, Peregrinibacteria bacterium, Parcubacteria bacterium, Smithella, Acidaminococcus, Candidatus Methanoplasma termitum, Eubacterium eligens, Moraxella bovoculi, Leptospira inadai, Porphyromonas crevioricanis, Prevotella disiens, или Porphyromonas macacae. В некоторых вариантах осуществления нуклеаза Cas представляет собой нуклеазу Cpf1 из Acidaminococcus или Lachnospiraceae.

[00351] В некоторых вариантах осуществления никаза Cas получена из нуклеазы Cas9 из Streptococcus pyogenes. В некоторых вариантах осуществления никаза Cas получена из нуклеазы Cas9 из Streptococcus thermophilus. В некоторых вариантах осуществления никаза Cas представляет собой никазная форма нуклеазы Cas9 из Neisseria meningitidis. См., например, WO/2020081568, описывающий слитый белок никазы Nme2Cas9 D16A. В некоторых вариантах осуществления никаза Cas получена из нуклеазы Cas9 из Staphylococcus aureus. В некоторых вариантах осуществления никаза Cas получена из нуклеазы Cpf1 из Francisella novicida. В некоторых вариантах осуществления никаза Cas получена из нуклеазы Cpf1 из Acidaminococcus sp. В некоторых вариантах осуществления никаза Cas получена из нуклеазы Cpf1 из Lachnospiraceae bacterium ND2006. В дополнительных вариантах осуществления никаза Cas получена из нуклеазы Cpf1 из Francisella tularensis, Lachnospiraceae bacterium, Butyrivibrio proteoclasticus, Peregrinibacteria bacterium, Parcubacteria bacterium, Smithella, Acidaminococcus, Candidatus Methanoplasma termitum, Eubacterium eligens, Moraxella bovoculi, Leptospira *inadai, Porphyromonas crevioricanis, Prevotella disiens или Porphyromonas macacae*. В некоторых вариантах осуществления никаза Cas получена из нуклеазы Cpf1 из Acidaminococcus или Lachnospiraceae. Как обсуждалось в другом месте, никаза может

быть получена из нуклеазы путем инактивации одного из двух каталитических доменов, например, путем мутации остатка активного сайта, необходимого для нуклеолиза, такого как D10, H840 N863 в Cas9 Spy. Специалист в данной области техники должен быть знаком с методами легкой идентификации соответствующих остатков в других белках Cas, такими как выравнивание последовательностей и структурное выравнивание, которые подробно обсуждаются ниже.

[00352] В некоторых вариантах осуществления нРНК вместе с РНК-направляемым ДНК-связывающим агентом называется рибонуклеопротеиновым комплексом (РНП). В некоторых вариантах осуществления РНК-направляемый ДНК-связывающий агент представляет собой нуклеазу Cas. В некоторых вариантах осуществления нРНК вместе с нуклеазой Cas называется РНП Cas. В некоторых вариантах реализации РНП содержит компоненты типа I, типа II или типа III. В некоторых вариантах осуществления нуклеаза Cas представляет собой белок Cas9 из системы CRISPR/Cas типа II. В некоторых вариантах осуществления нРНК вместе с Cas9 называется РНП Cas9.

[00353] Cas9 дикого типа имеет два нуклеазных домена: RuvC и HNH. Домен RuvC расщепляет нецелевую цепь ДНК, а домен HNH расщепляет целевую цепь ДНК. В некоторых вариантах осуществления белок Cas9 содержит более одного домена RuvC и/или более одного домена HNH. В некоторых вариантах осуществления белок Cas9 представляет собой белок Cas9 дикого типа. В каждом из вариантов композиции, применения и способа Cas индуцирует двухцепочечный разрыв направляющей ДНК.

[00354] В некоторых вариантах осуществления применяются химерные нуклеазы Cas, где один домен или область белка заменены частью другого белка. В некоторых вариантах осуществления домен нуклеазы Cas может быть заменен доменом другой нуклеазы, такой как Fok1. В некоторых вариантах осуществления нуклеаза Cas может представлять собой модифицированную нуклеазу.

[00355] В других вариантах осуществления нуклеаза Cas может происходить из системы CRISPR/Cas типа I. В некоторых вариантах осуществления нуклеаза Cas может представлять собой компонент комплекса Cascade системы CRISPR/Cas типа I. В некоторых вариантах осуществления нуклеаза Cas может представлять собой белок Cas3. В некоторых вариантах осуществления нуклеаза Cas может происходить из системы CRISPR/Cas типа III. В некоторых вариантах осуществления нуклеаза Cas может иметь активность расщепления РНК.

[00356] В некоторых вариантах осуществления РНК-направляемый ДНК-связывающий агент обладает одноцепочечной никазной активностью, то есть может разрезать одну цепь ДНК с образованием разрыва одной цепи, также известного как «одноцепочечный разрыв». В некоторых вариантах осуществления РНК-направляемый ДНК-связывающий агент содержит никазу Cas. Никаза представляет собой фермент, который создает разрыв в двухцепочечной ДНК, то есть разрезает одну цепь двойной спирали ДНК, но не другую. В некоторых вариантах осуществления никаза Cas представляет собой вариант нуклеазы Cas (например, нуклеазы Cas, описанной выше), в

котором эндонуклеолитический активный центр инактивирован, например, одним или большим количеством изменений (*например*, точечными мутациями) в каталитическом домене. *См., например*, патент США № 8889356 для обсуждения никаз Cas и типичных изменений каталитических доменов. В некоторых вариантах осуществления никаза Cas, такая как никаза Cas9, имеет инактивированный домен RuvC или HNH.

[00357] В некоторых вариантах осуществления РНК-направляемый ДНК-связывающий агент модифицируют так, что он содержит только один функциональный домен нуклеазы. Например, белок-агент может быть модифицирован таким образом, что один из доменов нуклеазы мутирует, или полностью, или частично удаляется, чтобы снизить его активность по расщеплению нуклеиновых кислот. В некоторых вариантах осуществления используют никазу, имеющую домен RuvC с пониженной активностью. В некоторых вариантах осуществления используют никазу, имеющую неактивный домен RuvC. В некоторых вариантах осуществления используют никазу, имеющую домен HNH с пониженной активностью. В некоторых вариантах осуществления используют никазу, имеющую неактивный домен HNH.

[00358] В некоторых вариантах осуществления консервативную аминокислоту в домене белка-нуклеазы Cas замещают для снижения или изменения нуклеазной активности. В некоторых вариантах осуществления нуклеаза Cas может содержать аминокислотную замену в RuvC или RuvC-подобном нуклеазном домене. Типовые аминокислотные замены в RuvC или RuvC-подобном нуклеазном домене включают D10A (на основе белка Cas9 S. pyogenes). *См.*, *например*, Zetsche et al. (2015) Cell 22 октября: 163 (3): 759-771. В некоторых вариантах осуществления нуклеаза Cas может содержать аминокислотную замену в HNH или HNH-подобном нуклеазном домене. Типовые аминокислотные замены в HNH или HNH-подобном нуклеазном домене включают E762A, H840A, N863A, H983A и D986A (на основе белка Cas9 S. pyogenes). *См.*, *например*, Zetsche et al. (2015). Другие типовые аминокислотные замены включают D917A, E1006A и D1255A (на основе последовательности Cpf1 Francisella novicida U112 (FnCpf1) (UniProtKB - A0Q7Q2 (CPF1_FRATN)).

[00359] В некоторых вариантах осуществления мРНК, кодирующая никазу, предложена в комбинации с парой РНК-направляемых, которые комплементарны смысловой и антисмысловой цепям целевой последовательности, соответственно. В данном варианте осуществления направляющие РНК направляют никазу на целевую последовательность и вводят DSB путем образования одноцепочечных разрывов на противоположных цепях целевой последовательности (то есть, двойной одноцепочечный разрыв). В некоторых вариантах осуществления использование двойного одноцепочечного разрыва может улучшать специфичность и уменьшать побочные эффекты. В некоторых вариантах осуществления никаза используется вместе с двумя отдельными направляющими РНК, нацеленными на противоположные цепи ДНК, для создания двойного одноцепочечного разрыва в целевой ДНК. В некоторых вариантах осуществления никаза используется вместе с двумя отдельными направляющими РНК,

которые выбраны так, чтобы они находились в непосредственной близости, для создания двойного одноцепочечного разрыва в целевой ДНК.

[00360] В некоторых вариантах осуществления РНК-направляемый ДНК-связывающий агент не обладает клевазной и никазной активностью. В некоторых вариантах осуществления РНК-направляемый ДНК-связывающий агент содержит ДНК-связывающий полипептид dCas. Полипептид dCas обладает ДНК-связывающей активностью, где по существу не обладает каталитической (клевазной/никазной) активностью. В некоторых вариантах осуществления полипептид dCas представляет собой полипептид dCas9. В некоторых вариантах осуществления РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, не обладающий клевазной или никазной активностью, или ДНК-связывающий полипептид dCas представляет собой вариант нуклеазы Cas (*например*, описанной выше нуклеазы Cas), в котором ее эндонуклеолитические активные центры инактивированы, например путем одного или более изменений (*например*, точечных мутаций) в ее каталитических доменах. См., например, US 2014/0186958 A1; US 2015/0166980 A1.

[00361] В некоторых вариантах осуществления РНК-направляемый ДНК-связывающий агент содержит один или большее количество гетерологичных функциональных доменов (например, представляет собой или содержит слитый полипептид).

[00362] В некоторых вариантах осуществления РНК-направляемый ДНК-связывающий агент содержит APOBEC3 дезаминазу. В некоторых вариантах осуществления деаминаза APOBEC3 представляет собой APOBEC3A (A3A). В некоторых вариантах осуществления A3A представляет собой A3A человека. В некоторых вариантах осуществления A3A представляет собой A3A дикого типа.

[00363] В некоторых вариантах осуществления РНК-направляемый ДНК-связывающий агент содержит дезаминазу и РНК-направляемую никазу. В некоторых вариантах осуществления мРНК дополнительно содержит линкер для связывания последовательности, кодирующей A3A, с последовательностью, кодирующей РНК-направляемую никазу. В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой органическую молекулу, группу, полимер или химическую часть. В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой пептидный линкер. В некоторых вариантах осуществления пептидный линкер представляет собой любой аминокислотный участок, содержащий по меньшей мере 1, по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 6, по меньшей мере 7, по меньшей мере 8, по меньшей мере 9, по крайней мере 10, по крайней мере 15, по крайней мере 20, по крайней мере 25, по крайней мере 30, по крайней мере 40, по крайней мере 50 или более аминокислот. В некоторых вариантах осуществления пептидный линкер представляет собой линкер «XTEN» из 16 остатков или его вариант (см., например, «Примеры» и Schellenberger et al. A recombinant polypeptide extends the in vivo half-life of peptides and proteins in a tunable manner. Nat. Biotechnol. 27, 1186-1190 (2009)). В некоторых вариантах

осуществления линкер XTEN содержит последовательность SGSETPGTSESATPES (SEQ ID NO: 900), SGSETPGTSESA (SEQ ID NO: 901) или SGSETPGTSESATPEGGSGGS (SEQ ID NO: 902). В некоторых вариантах осуществления пептидный линкер содержит одну или несколько последовательностей, выбранных из SEQ ID NO: 903-913.

[00364] В некоторых вариантах осуществления гетерологичный функциональный домен может облегчать транспорт РНК-направляемого ДНК-связывающего агента в ядро клетки. Например, гетерологичный функциональный домен может представлять собой сигнал ядерной локализации (NLS). В некоторых вариантах осуществления РНК-направляемый ДНК-связывающий агент может быть слит с 1-10 NLS. В некоторых вариантах осуществления РНК-направляемый ДНК-связывающий агент может быть слит с 1-5 NLS. В некоторых вариантах осуществления РНК-направляемый ДНК-связывающий агент может быть слит с одним NLS. Если применяется один NLS, то NLS может быть слит на N-конце или C-конце последовательности РНК-направляемого ДНК-связывающего агента. Он также может быть вставлен в последовательность РНК-направляемого ДНК-связывающего агента. В других вариантах осуществления РНК-направляемый ДНК-связывающий агент может быть слит с более чем одним NLS. В некоторых вариантах осуществления РНК-направляемый ДНК-связывающий агент может быть слит с 2, 3, 4 или 5 NLS. В некоторых вариантах осуществления РНК-направляемый ДНК-связывающий агент может быть слит с двумя NLS. В определенных обстоятельствах два NLS могут быть одинаковыми (*например*, два NLS SV40) или разными. В некоторых вариантах осуществления РНК-направляемый ДНК-связывающий агент слит с двумя последовательностями NLS (например, SV40), слитыми на карбокси конце. В некоторых вариантах осуществления РНК-направляемый ДНК-связывающий агент может быть слит с двумя NLS, один из которых связан на N-конце, а другой на C-конце. В некоторых вариантах осуществления РНК-направляемый ДНК-связывающий агент может быть слит с 3 NLS. В некоторых вариантах осуществления РНК-направляемый ДНК-связывающий агент может быть слит без NLS. В некоторых вариантах осуществления NLS может представлять собой одинарную последовательность, такую как, *например*, SV40 NLS, PKKKRKV (SEQ ID NO: 600) или PKKKRRV (SEQ ID NO: 601). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения NLS может представлять собой двойную последовательность, такую как NLS нуклеоплазмина, KRPAATKKAGQAKKKK (SEQ ID NO: 602). В конкретном варианте осуществления настоящего изобретения один NLS PKKKRKV (SEQ ID NO: 600) может быть слит на C-конце РНК-направляемого ДНК-связывающего агента. В сайт слияния необязательно включены один или большее количество линкеров.

[00365] В некоторых вариантах осуществления РНК-направляемый ДНК-связывающий агент содержит редактор. Примером редактора является BC22n, который включает APOBEC3A H. sapiens, слитую с никазой Cas9 S. pyogenes-D10A с помощью линкера XTEN, и мРНК, кодирующую BC22n. Предоставляется мРНК, кодирующая BC22n (SEQ ID NO:804).

[00366] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения гетерологичный функциональный домен может быть способен модифицировать внутриклеточное время полужизни РНК-направляемого ДНК-связывающего агента. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения период полужизни РНК-направляемого ДНК-связывающего агента может быть увеличен. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения период полужизни РНК-направляемого ДНК-связывающего агента может быть уменьшен. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения гетерологичный функциональный домен может быть способен повышать стабильность РНК-направляемого ДНК-связывающего агента. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения гетерологичный функциональный домен может быть способен снижать стабильность РНК-направляемого ДНК-связывающего агента. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения гетерологичный функциональный домен может действовать как сигнальный пептид для деградации белка. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения разложение белка может быть опосредовано протеолитическими ферментами, такими как, например, протеасомы, лизосомальные протеазы или кальпаин-протеазы. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения гетерологичный функциональный домен может содержать последовательность PEST. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения РНК-направляемый ДНК-связывающий агент может быть модифицирован путем добавления убиквитина или полиубиквитиновой цепи. В некоторых вариантах осуществления убиквитин может представлять собой убиквитин-подобный белок (UBL). Неограничивающие примеры убиквитин-подобных белков включают малый убиквитин-подобный модификатор (SUMO), убиквитиновый перекрестно-реактивный белок (UCRP, также известный как стимулируемый интерфероном ген-15 (ISG15)), связанный с убиквитином модификатор-1 (URM1), белок-8, подавляющий экспрессию набора генов в предшественниках нервных клеток в процессе развития (NEDD8, также называемый Rub1 в S. cerevisiae), белок, ассоциированный с антигеном F лейкоцитов человека (FAT10), белок аутофагии-8 (ATG8) и -12 (ATG12), убиквитин-подобный белок Fau (FUB1), закрепленный на мембране UBL (MUB), убиквитин-свернутый модификатор-1 (UFM1) и убиквитин-подобный белок-5 (UBL5).

[00367] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения гетерологичный функциональный домен может представлять собой маркерный домен. Неограничивающие примеры маркерных доменов включают в себя флуоресцентные белки, метки для очистки, эпитопные метки и последовательности репортерных генов. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения маркерный домен может представлять собой флуоресцентный белок. Неограничивающие примеры подходящих флуоресцентных белков включают зеленые флуоресцентные белки (*например*, GFP, GFP-2, tagGFP, turboGFP, sfGFP, EGFP, Emerald, Azami Green, мономерный Azami Green, CopGFP, AceGFP, ZsGreen1), желтые флуоресцентные белки (*например*, YFP, EYFP, Citrine, Venus, YPet, PhiYFP, ZsYellow1), синие флуоресцентные белки (*например*, EBFP,

EBFP2, Azurite, mKalamal, GFPuv, Sapphire, T-sapphire), голубые флуоресцентные белки (*например*, ECFP, Cerulean, CyPet, AmCyan1, Midoriishi-Cyan), красные флуоресцентные белки (*например*, mKate, mKate2, mPlum, DsRed мономер, mCherry, mRFP1, DsRed-Express, DsRed2, DsRed-Monomer, HcRed-Tandem, HcRed1, AsRed2, eqFP611, mRasberry, mStrawberry, Jred) и оранжевые флуоресцентные белки (mOrange, mKO, Kusabira-Orange, Monomeric Kusabira-Orange, mTangerine, tdTomato) или любой другой подходящий флуоресцентный белок. В других вариантах осуществления настоящего изобретения маркерный домен может представлять собой метку для очистки и/или эпитопную метку. Неограничивающие иллюстративные метки включают глутатион-S-трансферазу (GST), хитин-связывающий белок (CBP), мальтозосвязывающий белок (MBP), тиоредоксин (TRX), поли(NANP), метку для тандемной аффинной очистки (TAP), myc, AcV5 , AU1, AU5, E, ECS, E2, FLAG, HA, nus, Softag 1, Softag 3, Strep, SBP, Glu-Glu, HSV, KT3, S, S1, T7, V5, VSV-G, 6xHis, 8xHis, белок носитель биотин карбоксила (BCCP), поли-His и кальмодулин. Неограничивающие иллюстративные репортерные гены включают глутатион-S-трансферазу (GST), пероксидазу хрена (HRP), хлорамфеникол-ацетилтрансферазу (CAT), бета-галактозидазу, бета-глюкуронидазу, люциферазу или флуоресцентные белки.

[00368] В дополнительных вариантах осуществления настоящего изобретения гетерологичный функциональный домен может нацеливать РНК-направляемый ДНК-связывающий агент на конкретную органеллу, тип клетки, ткань или орган. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения гетерологичный функциональный домен может нацеливать РНК-направляемый ДНК-связывающий агент на митохондрии.

[00369] В дополнительных вариантах осуществления настоящего изобретения гетерологичный функциональный домен может представлять собой редакторный домен. Если РНК-направляемый ДНК-связывающий агент направляется на его последовательность, *например*, когда нуклеаза Cas направляется на целевую последовательность с помощью нРНК, эффектор, такой как редактор домена, может модифицировать целевую последовательность или воздействовать на нее. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения эффекторный домен, такой как редактор домена, может быть выбран из связывающего нуклеиновые кислоты домена, домена нуклеазы (например, домена отличной от нуклеазы Cas), домена эпигенетической модификации, активирующего транскрипцию домена или домена транскрипционного репрессора. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения гетерологичный функциональный домен представляет собой нуклеазу, такую как нуклеаза FokI. См., например, патент США № 9023649. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения гетерологичный функциональный домен представляет собой транскрипционный активатор или репрессор. См., например, Qi et al., “Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression,” Cell 152:1173-83 (2013); Perez-Pinera et al., “RNA-guided gene activation by CRISPR-Cas9-based transcription factors,” Nat. Methods 10:973-6 (2013); Mali et al., “CAS9 transcriptional

activators for target specificity screening and paired nickases for cooperative genome engineering," Nat. Biotechnol. 31:833-8 (2013); Gilbert et al., "CRISPR-mediated modular RNA-guided regulation of transcription in eukaryotes," Cell 154:442-51 (2013). Поскольку, РНК-направляемый ДНК-связывающий агент по существу становится фактором транскрипции, который может быть направлен на связывание желаемой целевой последовательности с применением направляющих РНК.

Определение эффективности направляющих РНК

[00370] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения эффективность направляющей РНК определяется при доставке или экспрессии вместе с другими компонентами (*например*, РНК-направляемым ДНК-связывающим агентом), образующими РНП. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения направляющая РНК экспрессируется вместе с РНК-направляемым ДНК-связывающим, таким как белок Cas, *например*, Cas9. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения направляющая РНК доставляется или экспрессируется в клеточной линии, которая уже стабильно экспрессирует РНК-направляемую ДНК-нуклеазу, такую как нуклеаза или никаза Cas, *например*, нуклеаза или никаза Cas9. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения направляющая РНК доставляется в клетку как часть РНП. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения направляющая РНК доставляется в клетку вместе с мРНК, кодирующей РНК-направляемую ДНК-нуклеазу, такую как нуклеаза или никаза Cas, *например*, нуклеаза или никаза Cas9.

[00371] Как описано в настоящем документе, применение РНК-направляемой ДНК-нуклеазы и направляющей РНК, описанных в настоящем документе, может привести к DSB, SSB и/или сайт-специфичному связыванию, что приводит к модификации нуклеиновой кислоты в ДНК или пре-мРНК, что может привести к ошибкам в форме вставных/делеционных (индел) мутаций при репарации клеточным механизмом. Многие мутации из-за вставок изменяют рамку считывания, вводят преждевременные стоп-кодоны или вызывают пропуск экзонов и, следовательно, производят нефункциональный белок.

[00372] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения эффективность конкретных направляющих РНК определяют на основе моделей in vitro. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения модель in vitro представляет собой Т-клеточную линию. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения модель in vitro представляет собой Т-клетки HEK293. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения модель in vitro представляет собой клетки HEK293, стабильно экспрессирующие Cas9 (HEK293_Cas9). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения модель in vitro представляет собой линию лимфобластоидных клеток. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения модель in vitro представляет собой первичные Т-клетки человека. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения модель in vitro представляет

собой первичные В-клетки человека. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения модель in vitro представляет собой первичные лимфоциты периферической крови человека. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения модель in vitro представляет собой первичные мононуклеарные клетки периферической крови человека.

[00373] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения количество нецелевых сайтов, в которых происходит делеция или вставка, в модели in vitro определяют, например, путем анализа геномной ДНК из клеток, трансфицированных in vitro мРНК Cas9 и направляющей РНК. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения такое определение включает анализ геномной ДНК клеток, трансфицированных in vitro мРНК Cas9, направляющей РНК и донорным олигонуклеотидом. Типичные процедуры для таких определений представлены в рабочих примерах ниже.

[00374] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения эффективность конкретных нРНК определяют на множестве клеточных моделей in vitro для процесса отбора направляющей РНК. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения проводят сравнение данных клеточной линии с выбранными направляющими РНК. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения выполняется перекрестный скрининг в нескольких моделях клеток.

[00375] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения эффективность конкретных направляющих РНК определяют на основе моделей in vivo. В некоторых вариантах осуществления модель in vivo представляет собой модель грызунов. В некоторых вариантах осуществления моделью грызунов является мышь, которая экспрессирует целевой ген. В некоторых вариантах осуществления моделью грызунов является мышь, которая экспрессирует ген CIITA. В некоторых вариантах осуществления моделью грызунов является мышь, которая экспрессирует ген CIITA человека. В некоторых вариантах осуществления моделью грызунов является мышь, которая экспрессирует ген B2M. В некоторых вариантах осуществления моделью грызунов является мышь, которая экспрессирует ген B2M человека. В некоторых вариантах осуществления модель in vivo представляет собой примата, отличного от человека, например яванского макака.

[00376] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения эффективность направляющей РНК оценивают по эффективности расщепления мишени. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения эффективность направляющей РНК измеряется процентным редактированием в целевом месте, *например*, CIITA или B2M. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения можно применять глубокое секвенирование для выявления наличия модификаций (*например*, вставок, делеций), внесенных в результате редактирования генов. Процент инделей может быть рассчитан из секвенирования следующего поколения «NGS».

[00377] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения эффективность направляющей РНК измеряют по количеству и/или частоте вставок в нецелевых последовательностях в геноме целевого типа клеток. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предусмотрены эффективные направляющие РНК, которые продуцируют индели в нецелевых сайтах с очень низкой частотой (например, <5%) в клеточной популяции и/или относительно частоты образования инделей в целевом сайте. Таким образом, настоящее изобретение относится к направляющим РНК, которые не проявляют образования нецелевых вставок в целевых клетках (*например*, Т-клетках или В-клетках) или которые вызывают образование нецелевых вставок с частотой <5% в клеточной популяции и/или относительно частоты создания инделей на целевом сайте. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения в описании представлены направляющие РНК, которые не обнаруживают образования нецелевых инделей в целевых клетках (*например*, Т-клетках или В-клетках). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предусмотрены направляющие РНК, которые продуцируют индели менее чем в 5 нецелевых сайтах, например, при оценке одним или большем количеством способов, описанными в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предусмотрены направляющие РНК, которые продуцируют индел менее чем или равном 4, 3, 2 или 1 нецелевом(ых) сайте(ах), например, при оценке одним или большем количеством способов, описанными в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения нецелевой(е) сайт(ы) не встречается в области, кодирующей белок, в геноме целевой клетки (*например*, Т-клеток или В-клеток).

[00378] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения линейная амплификация применяется для обнаружения событий редактирования генов, таких как образование инсерционных/делеционных («индел») мутаций, транслокаций и случаев направленной гомологии репарации (HDR) в целевой ДНК. Например, может быть применена линейная амплификация с уникальным праймером с меченной последовательностью и выделением меченых продуктов амплификации (далее именуемый как «UnIT» или «способ мечения уникальным идентификатором»).

[00379] В некоторых вариантах осуществления эффективность направляющей РНК измеряется количеством хромосомных перестроек в пределах клеткок-мишеней. Анализ хроматида dGH можно применять для обнаружения хромосомных перестроек, включая, например, транслокации, реципрокные транслокации, транслокации в нецелевые хромосомы, делеции (*т. е.* хромосомные перестройки, при которых фрагменты были потеряны во время цикла репликации клеток из-за случая редактирования). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения целевой тип клеток имеет менее 10, менее 8, менее 5, менее 4, менее 3, менее 2 или менее 1 хромосомной перестройки. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения тип целевой клетки не имеет хромосомных перестроек.

Доставка композиций нРНК

[00380] Липидные наночастицы (ЛНЧ) являются хорошо известными средствами доставки нуклеотидного и белкового груза и могут быть применены для доставки направляющих РНК, композиций или фармацевтических составов, описанных в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения ЛНЧ доставляют нуклеиновую кислоту, белок или нуклеиновую кислоту вместе с белком.

[00381] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения изобретение включает способ доставки любой из нРНК, описанных в настоящем документе, субъекту, где нРНК составлена как ЛНЧ. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения ЛНЧ содержит нРНК и Cas9 или мРНК, кодирующую Cas9.

[00382] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения изобретение включает композицию, содержащую любую из описанных нРНК и ЛНЧ. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения композиция дополнительно содержит Cas9 или мРНК, кодирующую Cas9.

[00383] В определенных вариантах осуществления ЛНЧ содержат катионные липиды. В некоторых вариантах осуществления ЛНЧ содержат (9Z,12Z)-3-((4,4-бис(октилокси)бутаноил)окси)-2-((((3-(диэтиламино)пропокси)карбонил)окси)метил) пропилоктадека-9,12-диеноат, также называемый 3-((4,4-бис(октилокси)бутаноил)окси)-2-((((3-(диэтиламино)пропокси)карбонил)окси)метил)пропил(9Z,12Z)-октадека-9,12-диеноат) или другой ионизируемый липид. См., например, липиды из WO/2017/173054 и ссылки, описанные в нем. В некоторых вариантах осуществления ЛНЧ содержат молярные отношения катионного липидного амина к фосфату РНК (N:P) около 4,5, 5,0, 5,5, 6,0 или 6,5. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения термины «катионный» и «ионизируемый» в контексте липидов ЛНЧ являются взаимозаменяемыми, например, где ионизируемые липиды являются катионными в зависимости от pH.

[00384] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения нРНК, описанные в настоящем документе, составлены в виде ЛНЧ для применения при приготовлении лекарственного средства для лечения заболевания или расстройства.

[00385] Электропорация является хорошо известным способом доставки груза, и любая методология электропорации может быть применена для доставки любой из нРНК, описанных в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения электропорация может быть применена для доставки любой из нРНК, описанных в настоящем документе, и Cas9 или мРНК, кодирующей Cas9.

[00386] В некоторых вариантах осуществления изобретение включает способ доставки любой из нРНК, описанных в данном документе, в клетку ex vivo, где нРНК составлена в виде ЛНЧ или не составлена в виде ЛНЧ. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения ЛНЧ содержит нРНК и Cas9 или мРНК, кодирующую Cas9.

[00387] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения композиции направляющей РНК, описанные в настоящем документе, отдельно или

закодированные на одном или большем количествам векторах, входят в состав липидных наночастиц или вводятся через них; см., например, WO/2017/173054 и WO 2019/067992, содержание которых полностью включено в настоящее описание посредством ссылки.

[00388] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения изобретение включает векторы ДНК или РНК, кодирующие любую из направляющих РНК, содержащих любую одну или большее количество направляющих последовательностей, описанных в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения в дополнение к последовательностям направляющих РНК векторы дополнительно содержат нуклеиновые кислоты, которые не кодируют направляющие РНК. Нуклеиновые кислоты, которые не кодируют направляющие РНК, включают, помимо прочего, промоторы, энхансеры, регуляторные последовательности и нуклеиновые кислоты, кодирующие РНК-направляемую ДНК-нуклеазу, которая может представлять собой нуклеазу, такую как Cas9. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения вектор содержит одну или большее количество нуклеотидных последовательностей, кодирующих crРНК, trРНК или crРНК и trРНК. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения вектор содержит одну или большее количество нуклеотидных последовательностей, кодирующих онРНК и мРНК, кодирующую РНК-направляемую ДНК-нуклеазу, которая может представлять собой нуклеазу Cas, такую как Cas9 или Cpf1. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения вектор содержит одну или большее количество нуклеотидных последовательностей, кодирующих crРНК, trРНК и мРНК, кодирующую РНК-направляемую ДНК-нуклеазу, которая может представлять собой белок Cas, такой как Cas9. В одном варианте осуществления настоящего изобретения Cas9 получен из Streptococcus pyogenes (т.е. Cas9 Spy). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения нуклеотидная последовательность, кодирующая crРНК, trРНК или crРНК и trРНК (которая может представлять собой онРНК), содержит или состоит из направляющей последовательности, фланкированной полностью или частью повторяющейся последовательности из природной системы CRISPR/Cas. Нуклеиновая кислота, содержащая или состоящая из crРНК, trРНК или crРНК и trРНК, может дополнительно содержать векторную последовательность, где векторная последовательность содержит или состоит из нуклеиновых кислот, которые не встречаются в природе вместе с crРНК, trРНК или crРНК и trРНК.

Терапевтические способы и применения

[00389] Любые из сконструированных клеток и композиций, описанных в настоящем документе, можно применять в способе лечения различных заболеваний и нарушений, как описано в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения генетически модифицированная клетка (сконструированная клетка) и/или популяция генетически модифицированных клеток (сконструированная клетка) и композиции могут быть применены в способах лечения различных заболеваний и нарушений. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения

охватывается способ лечения любого из заболеваний или нарушений, описанных в настоящем документе, включающий введение любой одной или большего количества композиций, описанных в настоящем документе.

[00390] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения способы и композиции, описанные в настоящем документе, можно применять для лечения заболеваний или нарушений, требующих доставки терапевтического агента. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, изобретение обеспечивает способ обеспечения иммунотерапии у субъекта, причем способ включает введение субъекту эффективного количества сконструированной клетки (или популяции сконструированных клеток), как описано в настоящем документе, например, клетки любого из вышеупомянутых клеточных аспектов и варианты осуществления.

[00391] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения способы включают введение субъекту композиции, содержащей сконструированную клетку, описанную в настоящем документе, в качестве терапии на основе адоптивного переноса клеток. В некоторых вариантах осуществления сконструированная клетка представляет собой аллогенную клетку.

[00392] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения способы включают введение субъекту композиции, содержащей сконструированную клетку, описанную в настоящем документе, где клетка продуцирует, секретирует и/или экспрессирует полипептид (например, нацеливающий рецептор), пригодный для лечения заболевания или расстройства в предмет. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения клетка действует как клеточная фабрика по производству растворимого полипептида. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения клетка действует как клеточная фабрика по производству антитела. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения клетка непрерывно секретирует полипептид in vivo. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения клетка непрерывно секретирует полипептид после трансплантации in vivo в течение по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5 или 6 недель. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения клетка непрерывно секретирует полипептид после трансплантации in vivo в течение более 6 недель. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения растворимый полипептид (*например*, антитело) продуцируется клеткой в концентрации по меньшей мере 10^2, 10^3, 10^4, 10^5, 10^6, 10^7 или 10^8 копий в день. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения полипептид представляет собой антитело и продуцируется клеткой в концентрации по меньшей мере 10^8 копий в день.

[00393] В некоторых вариантах осуществления способов, способ включает введение лимфодеплетирующего агента или иммунодепрессанта перед введением субъекту эффективного количества сконструированной клетки (или сконструированных клеток), как описано в настоящем документе, например, клетки любого из вышеупомянутых клеточных аспектов и вариантов осуществления. В другом аспекте

изобретение относится к способу получения сконструированных клеток (*например*, популяции сконструированных клеток).

[00394] Иммунотерапия - это лечение заболевания путем активации или подавления иммунной системы. Иммунотерапия, предназначенная для индукции или усиления иммунного ответа, классифицируется как активационная иммунотерапия. Было продемонстрировано, что клеточная иммунотерапия эффективна при лечении некоторых видов рака. Иммунные эффекторные клетки, такие как лимфоциты, макрофаги, дендритные клетки, естественные клетки-киллеры, цитотоксические Т-лимфоциты (CTL), Т-хелперы, В-клетки или их предшественники, такие как гемопоэтические стволовые клетки (HSC) или индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (iPSC) можно запрограммировать на действие в ответ на аномальные антигены, экспрессируемые на поверхности опухолевых клеток. Таким образом, иммунотерапия рака позволяет компонентам иммунной системы уничтожать опухоли или другие раковые клетки. Также было продемонстрировано, что клеточная иммунотерапия эффективна при лечении аутоиммунных заболеваний или отторжения трансплантата. Иммунные эффекторные клетки, такие как регуляторные Т-клетки (Treg) или мезенхимальные стволовые клетки, могут быть запрограммированы на действие в ответ на аутоантигены или антигены трансплантата, экспрессируемые на поверхности нормальных тканей.

[00395] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, изобретения относится к способу получения сконструированных клеток (*например*, популяции сконструированных клеток). Популяция сконструированных клеток может быть применена для иммунотерапии.

[00396] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, изобретение обеспечивает способ лечения субъекта, нуждающегося в этом, который включает введение сконструированных клеток, подготовленных описанным в настоящем документе способом получения клеток, например, способом любого из вышеупомянутых аспектов и вариантов осуществления способов получения клеток.

[00397] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения сконструированные клетки можно применять для лечения рака, инфекционных заболеваний, воспалительных заболеваний, аутоиммунных заболеваний, сердечно-сосудистых заболеваний, неврологических заболеваний, офтальмологических заболеваний, заболеваний почек, заболеваний печени, заболеваний опорно-двигательного аппарата, заболеваний эритроцитов или отторжения трансплантата. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения сконструированные клетки можно применять для трансплантации клеток, например, в сердце, печень, легкое, почку, поджелудочную железу, кожу или головной мозг. (*См., например*, Deuse et al., Nature Biotechnology 37:252-258 (2019).)

[00398] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения сконструированные клетки можно применять в качестве клеточной терапии, включающей терапию аллогенными стволовыми клетками. В некоторых вариантах осуществления

настоящего изобретения клеточная терапия включает индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (iPSC). iPSC можно индуцировать для дифференцировки в другие типы клеток, включая, *например*, бета-островковые клетки, нейроны и клетки крови. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения клеточная терапия включает гемопоэтические стволовые клетки. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения стволовые клетки содержат мезенхимальные стволовые клетки, которые могут развиваться в костные, хрящевые, мышечные и жировые клетки. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения стволовые клетки включают глазные стволовые клетки. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения аллогенная трансплантация стволовых клеток включает аллогенную трансплантацию костного мозга. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения стволовые клетки содержат плюрипотентные стволовые клетки (PSC). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения стволовые клетки включают индуцированные эмбриональные стволовые клетки (ESC).

[00399] Описанные в настоящем документе сконструированные клетки подходят для дальнейшего конструирования, *например*, путем введения дополнительно отредактированных или модифицированных генов или аллелей. В некоторых вариантах осуществления полипептид представляет собой ТКР дикого типа или его вариант. Клетки по изобретению также могут быть пригодны для дальнейшего конструирования путем введения экзогенной нуклеиновой кислоты, кодирующей, например, нацеливающий рецептор, *например*, ТКР, CAR, UniCAR. CAR также известны как химерные иммунорецепторы, химерные рецепторы Т-клеток или искусственные рецепторы Т-клеток.

[00400] В некоторых вариантах осуществления клеточная терапия представляет собой терапию трансгенными Т-клетками. В некоторых вариантах осуществления клеточная терапия включает трансгенную Т-клетку, нацеленную на белок 1 опухоли Вильмса (WT1). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения клеточная терапия включает нацеливающий рецептор или донорную нуклеиновую кислоту, кодирующую нацеливающий рецептор коммерчески доступной Т-клеточной терапии, такой как CAR-Т-клеточная терапия. В настоящее время для клеточной терапии одобрен ряд нацеливающих рецепторов. Клетки и способы, предусмотренные в настоящем документе, можно применять с этими известными конструкциями. Коммерчески одобренные клеточные продукты, которые включают конструкции нацеливающих рецепторов для применения в качестве клеточной терапии, включают, *например*, Kymriah® (tisagenlecleucel); Yescarta® (axicabtagene ciloleucel); Tecartus™ (brexucabtagene autoleucel); Tabelecleucel (Tab-cel®); Viralym-M (ALVR105); и Viralym-C.

[00401] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения способы предусматривают введение сконструированных клеток субъекту, где введение представляет собой инъекцию. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения способы предусматривают введение сконструированных клеток субъекту, где

введение представляет собой внутрисосудистую инъекцию или инфузию. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения способы предусматривают введение сконструированных клеток субъекту, где введение представляет собой разовую дозу.

[00402] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения способы обеспечивают уменьшение признака или симптома, связанного с заболеванием субъекта, получающего лечение композицией, описанной в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения у субъекта наблюдается ответ на лечение описанной в настоящем документе композицией, который длится более одной недели. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения у субъекта наблюдается ответ на лечение описанной в настоящем документе композицией, который длится более двух недель. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения у субъекта наблюдается ответ на лечение описанной в настоящем документе композицией, который длится более трех недель. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения у субъекта наблюдается ответ на лечение описанной в настоящем документе композицией, который длится более одного месяца.

[00403] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения способы предусматривают введение сконструированных клеток субъекту, где у субъекта наблюдается ответ на введенную клетку, который включает уменьшение признака или симптома, связанного с заболеванием, которое лечится клеточной терапией. В некоторых вариантах осуществления у субъекта наблюдается ответ, который длится более одной недели. В некоторых вариантах осуществления у субъекта наблюдается ответ, который длится более одного месяца. В некоторых вариантах осуществления у субъекта наблюдается ответ, который длится по меньшей мере 1-6 недель.

ПРИМЕРЫ

[00404] Следующие примеры представлены для иллюстрации некоторых описанных вариантов осуществления и не должны рассматриваться как ограничивающие каким-либо образом объем данного изобретения.

Пример 1. Общие методы

1.1. Секвенирование нового поколения («NGS»; англ.: Next-generation sequencing) и анализ эффективности целевого расщепления.

[00405] Геномную ДНК экстрагировали с использованием раствора для экстракции ДНК QuickExtract™ (Lucigen, кат. № QE09050) в соответствии с протоколом производителя.

[00406] Чтобы количественно определить эффективность редактирования в целевом месте генома, было использовано глубокое секвенирование для выявления наличия вставок и делеций, введенных при редактировании генов. Праймеры для ПЦР конструировали вокруг целевого сайта внутри интересующего гена (*например*, CIITA) и амплифицировали интересующую область генома. Схема последовательности праймера была выполнена в соответствии со стандартом в данной области техники.

[00407] Дополнительную ПЦР проводили в соответствии с протоколами

производителя (Illumina) для добавления химических компонентов для секвенирования. Ампликоны секвенировали на приборе Illumina MiSeq. Чтения были выровнены в отношении эталонного генома человека (например, hg38) после исключения тех, которые имели низкие баллы качества. Считывания, которые перекрывали интересующую целевую область, повторно выравнивали с локальной последовательностью генома для улучшения выравнивания. Затем рассчитывали количество считываний дикого типа по сравнению с количеством считываний, содержащих мутации C-на-T, мутации C-на-A/G или индели. Инсерции и делеции оценивали в области 20 п.н. с центром в предполагаемом сайте расщепления Cas9. Процент инделей определяли как общее количество считываний секвенирования с одним или несколькими вставленными или удаленными основаниями в оцениваемой области 20 п.н., деленное на общее количество считываний секвенирования, включая дикий тип. Мутации C-на-T или C-на-A/G оценивали в области 40 п.н., включая 10 п.н. выше и 10 п.н. ниже целевой последовательности онРНК длиной 20 п.н. Процент редактирования C-на-T определяли как общее количество считываний секвенирования с одной или несколькими мутациями C-наT в области 40 п.н., деленное на общее количество считываний секвенирования, включая дикий тип.Аналогичным образом рассчитывают процент мутаций C-на-A/G.

1.2. Приготовление среды для культивирования Т-клеток.

[00408] Составы сред для культивирования Т-клеток, используемые ниже, описаны в данном документе и в **Таблице 3.** «Базовая среда X-VIVO» состоит из среды X-VIVO™ 15, 1% пенстреп, 50 мкМ бета-меркаптоэтанола, 10 мМ NAC. В дополнение к вышеупомянутым компонентам, другими используемыми изменяемыми компонентам среды были: 1. Сыворотка (фетальная бычья сыворотка (ФБС)); и 2. Цитокины (IL-2, IL-7, IL-15), также описанные в **Таблице 3.** Компоненты среды для Т-клеток описаны в **Таблице 3** ниже.

[00409] **Таблица 3. Среда для Т-клеток.**

Базовая среда	**Сыворотка**	**Цитокины**	**Номер среды**
XVIVO™ 15 (Lonza, BE02-060Q) 1% пенстреп 50 мкМ бета-меркаптоэтанола 10 мМ N-ацетил-L-цистина (NAC)	5% человеческая сыворотка AB (Gemini Bio Products, 100-512)	5 нг/мл rh-IL2 5 нг/мл rh-IL7 200 Ед/мл rh IL-15	1
		5 нг/мл rh-IL2 200 Ед/мл rh IL-15	2
RPMI (Corning) 2 мМ L-глютамина 1% пенстреп 100 мкМ заменимых аминокислот 1 мМ пирувата натрия 10 мМ HEPES 55 мкМ бета-	10% фетальная бычья сыворотка	5 нг/мл rh-IL2	11

меркаптоэтанола			
RPMI 1640 (Corning) 1X глутамакса 1% пенстреп, 100 мкм заменимых аминокислот 1 мМ пирувата натрия 10 мМ буфера HEPES 55 мкМ бета-меркаптоэтанола	10% фетальная бычья сыворотка	без цитокинов	18
		100 Ед/мл rhIL-2 2,5 нг/мл rIL-7 2,5 нг/мл rIL-15	19
RPMI 1640 (Corning) 22мМ глутамакса 1% пенстреп, 100 мкм заменимых аминокислот 1 мМ пирувата натрия 10 мМ буфера HEPES 22 мкМ бета-меркаптоэтанола	10% фетальная бычья сыворотка	100 ЕД/мл rhIL-2	20

1.3. Получение липидных наночастиц.

[00410] Липидные компоненты растворяли в 100% этаноле в различных молярных соотношениях. Нагрузку РНК (например, мРНК Cas9 и онРНК) растворяли в 25 мМ цитрата, 100 мМ NaCl, pH 5,0, в результате чего концентрация нагрузки РНК составляла приблизительно 0,45 мг/мл.

[00411] Составные композиции липида и нуклеиновой кислоты содержали ионизируемый липид A ((9Z,12Z)-3-((4,4-бис(октилокси)бутаноил)окси)-2-((((3-(диэтиламино)пропокси)карбонил)окси)метил)пропилоктадека-9,12-диеноат, также называемый 3-((4,4-бис(октилокси)бутаноил)окси)-2-((((3-(диэтиламино)пропокси)карбонил)окси)метил)пропил(9Z,12Z)-октадека-9,12-диеноат), холестерин, DSPC и PEG2k-DMG в молярном соотношении 50:38:9:3, соответственно. Составные композиции липида и нуклеиновой кислоты были составлены с молярным соотношением амина липида к фосфату РНК (N:P) около 6 и соотношением нРНК к мРНК 1:1 по массе.

[00412] Липидные наночастицы (ЛНЧ) были приготовлены с использованием метода перекрестного потока с использованием ударно-струйного смешивания липида в этаноле с двумя объемами растворов РНК и одним объемом воды. Липиды в этаноле смешивали перекрестным смешиванием с двумя объемами раствора РНК. Четвертый поток воды смешивали с выходным потоком перекрестного смешивания через Т-образное соединение (*см.* WO 2016010840, фиг. 2). ЛНЧ выдерживали в течение 1 часа при комнатной температуре (КТ) и дополнительно разбавляли водой (приблизительно 1:1 об./об.). ЛНЧ концентрировали с использованием тангенциальной проточной фильтрации на картридже с плоским листом (Sartorius, MWCO 100 кДа) и заменяли буфер с

использованием колонок для обессоливания PD-10 (GE) на 50 мМ Трис, 45 мМ NaCl, 5% (масс./об.) сахарозы, pH 7,5 (TSS). В качестве альтернативы ЛНЧ необязательно концентрировали с использованием центрифужных фильтра Amicon 100 кДа, а буфер заменяли с использованием колонок для обессоливания PD-10 (GE) на TSS. Полученную смесь затем фильтровали с использованием стерильного фильтра 0,2 мкм. Конечную ЛНЧ хранили при температуре 4°C или -80°C до дальнейшего использования.

1.4. Транскрипция in vitro («IVT») мРНК нуклеазы

[00413] Кэпированную и полиаденилированную мРНК, содержащую N1-метил-псевдо-U, получали путем транскрипции in vitro с использованием матрицы линеаризованной плазмидной ДНК и РНК-полимеразы T7. Плазмидную ДНК, содержащую промотор T7, последовательность для транскрипции и область полиаденилирования, линеаризовали путем инкубации при 37°C в течение 2 часов с XbaI при следующих условиях: 200 нг/мкл плазмиды, 2 Ед/мкл XbaI (NEB) и 1x реакционный буфер. XbaI инактивировали нагреванием реакционной смеси при 65°C в течение 20 мин. Линеаризованную плазмиду очищали от фермента и солей буфера. Реакцию IVT для получения модифицированной мРНК проводили путем инкубации при 37°C в течение 1,5-4 часов в следующих условиях: 50 нг/мкл линеаризованной плазмиды; 2-5 мМ каждого из GTP, ATP, CTP и N1-метил-псевдо-UTP (Trilink); 10-25 мМ ARCA (Trilink); 5 Ед/мкл РНК-полимеразы T7 (NEB); 1 Ед/мкл мышиного ингибитора РНКазы (NEB); 0,004 Ед/мкл неорганической пирофосфатазы E. coli (NEB); и 1x реакционный буфер. TURBO ДНКазу (ThermoFisher) добавляли до конечной концентрации 0,01 Ед/мкл и реакционную смесь инкубировали в течение дополнительных 30 минут для удаления матрицы ДНК. мРНК очищали с применением набора для очистки транскрипции MegaClear (ThermoFisher) или набора RNeasy Maxi (Qiagen) в соответствии с протоколами производителей. Альтернативно, мРНК очищали по протоколу преципитации, за которым в некоторых случаях следовала очистка на основе ВЭЖХ.Вкратце, после расщепления ДНКазой мРНК очищают с применением преципитации LiCl, преципитации ацетатом аммония и преципитации ацетатом натрия.В случае мРНК, очищенной ВЭЖХ, после преципитации LiCl и восстановления мРНК очищали с помощью ОФ-ИП ВЭЖХ (см., *например*, Kariko, et al. Nucleic Acids Research, 2011, Vol. 39, No. 21 e142).Фракции, выбранные для объединения, объединяли и обессоливали осаждением ацетатом натрия/этанола, как описано выше. В еще одном альтернативном методе мРНК очищали методом преципитации LiCl с последующей дополнительной очисткой фильтрацией с тангенциальным потоком. Концентрации РНК определяли путем измерения поглощения света при 260 нм (Nanodrop), а транскрипты анализировали с помощью капиллярного электрофореза с помощью Bioanlayzer (Agilent).

[00414] мРНК Cas9 Streptococcus pyogenes («Spy») получали из плазмидной ДНК, кодирующей открытую рамку считывания в соответствии с SEQ ID NO: 801-803 (см. последовательности в **Таблице 19**). мРНК BC22n получали из плазмидной ДНК, кодирующей открытую рамку считывания в соответствии с SEQ ID NO: 804-805. мРНК

BC22 получали из плазмидной ДНК, кодирующей открытую рамку считывания в соответствии с SEQ ID No: 806. мРНК UGI получали из плазмидной ДНК, кодирующей открытую рамку считывания в соответствии с SEQ ID NO: 807-808. Когда SEQ ID NO: 801-808 упоминаются ниже в отношении РНК, подразумевается, что T должны быть заменены на U (которые представляли собой N1-метилпсевдоуридины, как описано выше). Информационные РНК, применяемые в примерах, включают 5'-кэп и 3'-область полиаденилирования, *например*, до 100 нуклеотидов, и идентифицируются с помощью SEQ ID NO: 801-808 в **Таблице 19** ниже.

Пример 2. Скрининг CIITA-направленных РНК.

[00415] CIITA-направленные РНК подвергали скринингу на эффективность в Т-клетках путем оценки потери экспрессии MHC класса II на клеточной поверхности. Процент Т-клеток, отрицательных в отношении белка MHC класса II («% отрицательных по MHC II»), анализировали после редактирования CIITA путем электропорации с РНП.

2.1. Электропорация РНП Т-клеток.

[00416] Редактирующую активность Cas9 оценивали с помощью электропорации рибонуклеопротеина Cas9 (РНП). После размораживания Т-клетки Pan CD3+ (StemCell, HLA-A*02.01/A*03.01) высевали с плотностью $0{,}5\times10^6$ клеток/мл в среду RPMI для Т-клеток, состоящую из RPMI 1640 (Invitrogen, кат. № 22400-089), содержащий 5% (об./об.) эмбриональной бычьей сыворотки, 1x Glutamax (Gibco, кат. № 35050-061), 50 мкМ 2-меркаптоэтанола, 100 мкМ заменимых аминокислот (Invitrogen, кат. № 11140-050), 1 мМ пирувата натрия, 10 мМ буфера HEPES, 1% пенициллина-стрептомицина и 100 Ед/мл рекомбинантного интерлейкина-2 человека (Peprotech, кат. № 200-02). Т-клетки активировали с помощью TransAct™ (разведение 1:100, Miltenyi Biotec). Клетки размножали в среде для Т-клеток RPMI в течение 72 часов перед трансфекцией РНП.

[00417] Нацеленные на CIITA онРНК удаляли из планшетов для хранения и денатурировали в течение 2 минут при 95°C перед охлаждением при комнатной температуре в течение 10 минут. Готовили смесь РНП из 20 мкМ онРНК и 10 мкМ рекомбинантного белка Cas9-NLS (SEQ ID NO: 800) и инкубировали при 25°C в течение 10 минут. Пять мкл смеси РНП объединяли со 100 000 клеток в 20 мкл буфера для электропорации P3 (Lonza). 22 мкл смеси РНП/клеток переносили в соответствующие лунки 96-луночного планшета для электропорации Lonza Shuttle. Клетки подвергали электропорации в двух экземплярах с кодом импульса производителя. Среду для Т-клеток RPMI добавляли к клеткам сразу после электропорации. Затем электропорированные Т-клетки культивировали и собирали для секвенирования NGS, как описано в Примере 1, через 2 дня после редактирования.

2.2. Проточная цитометрия.

[00418] На 10-й день после редактирования Т-клетки фенотипировали с помощью проточной цитометрии для определения экспрессии белка MHC класса II.Вкратце, Т-клетки инкубировали в коктейлях антител, нацеленных на HLA-DR, DQ, DP-PE (BioLegend® кат. № 361704), и с изотипическим контролем-AF647 (BioLegend® кат. №

400234). Затем клетки промывали, обрабатывали с помощью проточного цитометра Cytoflex (Beckman Coulter) и анализировали с применением программного пакета FlowJo. Т-клетки были отобраны на основе размера, формы, жизнеспособности и экспрессии MHC класса II. Образцы ДНК подвергали ПЦР и последующему NGS-анализу, как описано в Примере 1.

2.3. Результаты скрининга CIITA-направленной РНК.

[00419] **В Таблице 4А** показан средний процент Т-клеток, отрицательных в отношении экспрессии на клеточной поверхности MHC класса II. Контроль 1 и контроль 2 нацелены на B2M и TRAC, соответственно, для сравнительной экспрессии MHC класса I. Для каждой направляющей показаны геномные координаты сайта разреза с помощью spCas9, а также расстояние (количество нуклеотидов) между нуклеотидом, граничащим с акцепторным сайтом сплайсинга, или нуклеотидом, граничащим с донорным сайтом сплайсинга, и сайтом разреза (обозначены в **Таблице 4А** как расстояние от сайта разреза). Числовые значения без круглых скобок показывают количество нуклеотидов в направлении 5' между нуклеотидом, граничащим с сайтом сплайсинга, и сайтом разреза, тогда как числовые значения в круглых скобках показывают количество нуклеотидов в направлении 3' между нуклеотидом, граничащим с сайтом сплайсинга, и сайтом разреза. **В Таблице 4В** показаны результаты NGS-анализа.

[00420] **Таблица 4А: Скрининг CIITA-направленной РНК.**

Направляющая	**SEQ ID NO**	**Средний % отрицательных по MHC класса II**	**CO**	**Целевая послед.**	**Сайт разреза**	**Расстояние от сайта разреза (п.н.)**	**Положение в геноме**	**Геномные коорд.**
G018021	1	35,20	3,11	UCCUACCUGUCAGAGCCCCA	10 877 378	4	Экзон 1 конец	chr16:10877360-10877380
G018022	2	26,50	2,97	GAGCCCCAAGGUAAAAAGGC	10 877 390	(8)	Экзон 1 конец	chr16:10877372-10877392
G018023	3	27,15	5,16	AGCCCCAAGGUAAAAGGCC	10 877 391	(9)	Экзон 1 конец	chr16:10877373-10877393

G018024	4	30,40	2,55	UUUCCCGGCCUUUUUACCUU	10 877 382	-	Экзон 1 конец	chr16:10877379-10877399
G018025	5	30,40	1,84	CUUUCCCGGCCUUUUUACCU	10 877 383	(1)	Экзон 1 конец	chr16:10877380-10877400
G018026	6	39,50	5,09	ACACUGUGAGCUGCCUGGGA	10 895 278	4	Экзон 2 начало	chr16:10895275-10895295
G018027	7	38,70	0,28	CACACUGUGAGCUGCCUGGG	10 895 279	3	Экзон 2 начало	chr16:10895276-10895296
G018028	8	40,45	2,48	GUGGCACACUGUGAGCUGCC	10 895 283	(1)	Экзон 2 начало	chr16:10895280-10895300
G018029	9	36,70	2,83	GAGAUUGAGCUCUACUCAGG	10 895 427	1	Экзон 2 конец	chr16:10895409-10895429
G018030	10	67,35	4,60	AGAUUGAGCUCUACUCAGGU	10 895 428	-	Экзон 2 конец	chr16:10895410-10895430
G018031	11	26,85	5,45	CAGGUGGGCCCUCCUCCCUC	10 895 443	(15)	Экзон 2 конец	chr16:10895425-10895445
G018032	12	12,30	2,26	CGGAAGAGACCA	10 895 440	(12)	Экзон 2	chr16:10895437-10895457

				GAGGGAGG			конец	
G018033	13	31,45	2,33	UACCGGAAGAGACCAGAGGG	10 895 443	(15)	Экзон 2 конец	chr16:10895440-10895460
G018034	14	85,75	4,74	AGGGAGGCUUAUGCCAAUAU	10 895 760	4	Экзон 3 конец	chr16:10895742-10895762
G018035	15	80,00	2,97	GGCUUAUGCCAAUAUCGGUG	10 895 765	(1)	Экзон 3 конец	chr16:10895747-10895767
G018036	16	40,75	8,56	UGACUGCGCUUUUCCUUGUC	10 898 660	10	Экзон 4 начало	chr16:10898642-10898662
G018037	17	46,15	0,50	GACUGCGCUUUUCCUUGUCU	10 898 661	9	Экзон 4 начало	chr16:10898643-10898663
G018038	18	62,95	7,00	GCUUUUCCUUGUCUGGGCAG	10 898 667	3	Экзон 4 начало	chr16:10898649-10898669
G018039	19	43,85	3,04	CCAGUUCCGCUGCCCAGACA	10 898 661	9	Экзон 4 начало	chr16:10898658-10898678
G018040	20	29,65	3,47	GACCUGAAGCACUGGAAGCC	10 901 554	4	Экзон 6 конец	chr16:10901536-10901556

G018041	21	31,00	2,83	GCACUGGAAGCCAGGUGUGC	10 901 562	(4)	Экзон 6 конец	chr16:10901544-10901564
G018042	22	41,40	2,83	CACUGGAAGCCAGGUGUGCA	10 901 563	(5)	Экзон 6 конец	chr16:10901545-10901565
G018043	23	30,30	0,71	GGAAGCCAGGUGUGCAGGGC	10 901 567	(9)	Экзон 6 конец	chr16:10901549-10901569
G018044	24	25,90	0,28	AGCCAGGUGUGCAGGGCAGG	10 901 570	(12)	Экзон 6 конец	chr16:10901552-10901572
G018045	25	37,30	3,39	GCCCACCUGCCCUGCACACC	10 901 560	(2)	Экзон 6 конец	chr16:10901557-10901577
G018046	26	44,30	8,77	GGGCUCAGCUGUGAGGAAGU	10 902 028	10	Экзон 7 начало	chr16:10902025-10902045
G018047	27	42,15	5,73	GGGGCUCAGCUGUGAGGAAG	10 902 029	9	Экзон 7 начало	chr16:10902026-10902046
G018048	28	37,15	6,58	GACCAGAUUCCCAGUAUGUU	10 902 189	(5)	Экзон 7 конец	chr16:10902171-10902191
G018049	29	34,30	5,66	CCAGAUUCCCAG	10 902 191	(7)	Экзон 7	chr16:10902173-10902193

				UAUGUUAG			конец	
G018050	30	31,90	8,63	CAGAUUCCCAGUAUGUUAGG	10 902 192	(8)	Экзон 7 конец	chr16:10902174-10902194
G018051	31	30,50	5,66	UCCCAGUAUGUUAGGGGGCU	10 902 197	(13)	Экзон 7 конец	chr16:10902179-10902199
G018052	32	38,25	3,75	UCCAAGCCCCCUAACAUACU	10 902 186	(2)	Экзон 7 конец	chr16:10902183-10902203
G018053	33	34,20	6,08	CUCCAAGCCCCCUAACAUAC	10 902 187	(3)	Экзон 7 конец	chr16:10902184-10902204
G018054	34	37,20	3,82	AAAGGCACUGCAAGAGACAA	10 902 647	11	Экзон 8 начало	chr16:10902644-10902664
G018055	35	54,80	4,24	UCCAGUAUAUUCAUCUACCA	10 902 797	4	Экзон 8 конец	chr16:10902779-10902799
G018056	36	35,30	3,11	UUCAUCUACCAUGGUGAGUG	10 902 806	(5)	Экзон 8 конец	chr16:10902788-10902808
G018057	37	35,35	4,17	UCAUCUACCAUGGUGAGUGC	10 902 807	(6)	Экзон 8 конец	chr16:10902789-10902809

G018058	38	29,30	4,38	CAUCUACCAUGGUGAGUGCG	10 902 808	(7)	Экзон 8 конец	chr16:10902790-10902810
G018059	39	24,75	1,06	ACCAUGGUGAGUGCGGGGCC	10 902 813	(12)	Экзон 8 конец	chr16:10902795-10902815
G018060	40	34,75	5,02	GCCAGGCCCCGCACUCACCA	10 902 802	(1)	Экзон 8 конец	chr16:10902799-10902819
G018061	41	33,95	0,64	CCACUCUCCACCCCCAAUGU	10 903 726	5	Экзон 9 начало	chr16:10903708-10903728
G018062	42	60,40	3,54	CUCCACCCCCAAUGUAGGUG	10 903 731	-	Экзон 9 начало	chr16:10903713-10903733
G018063	43	33,05	8,56	CACCUCACCUACAUUGGGGG	10 903 721	10	Экзон 9 начало	chr16:10903718-10903738
G018064	44	35,55	7,00	GGGCACCUCACCUACAUUGG	10 903 724	7	Экзон 9 начало	chr16:10903721-10903741
G018065	45	46,45	2,19	UGGGGCACCUCACCUACAUU	10 903 726	5	Экзон 9 начало	chr16:10903723-10903743
G018066	46	50,95	2,19	CUGGGGCACCUC	10 903 727	4	Экзон 9	chr16:10903724-10903744

				ACCUAC AU			начало	
G018067	47	40,75	2,19	ACCUCC CGAGCA AACAUG AC	10 903 891	4	Экзон 9 конец	chr16:109038 73-10903893
G018068	48	33,90	2,83	CCGAGC AAACAU GACAGG UA	10 903 896	(1)	Экзон 9 конец	chr16:109038 78-10903898
G018069	49	29,25	1,91	GUACCU CUCACA GGCCCU AA	10 903 908	(13)	Экзон 9 конец	chr16:109039 05-10903925
G018070	50	20,85	1,48	AGUACC UCUCAC AGGCCC UA	10 903 909	(14)	Экзон 9 конец	chr16:109039 06-10903926
G018071	51	24,30	6,08	GACGUC UUGUGC UCUGGA GA	10 904 739	5	Экзон 10 начало	chr16:109047 36-10904756
G018072	52	33,90	5,37	AACAAG CUUCCA AAAUGG CC	10 904 808	4	Экзон 10 конец	chr16:109047 90-10904810
G018073	53	23,45	2,62	GAGAUC CCGCAU CACUCA CC	10 904 814	(2)	Экзон 10 конец	chr16:109048 11-10904831
G018074	54	68,40	1,56	GCCCCU GGCCUU UGCAGA GC	10 906 499	-	Экзон 11 начало	chr16:109064 81-10906501

G018075	55	54,70	3,54	ACCGGCUCUGCAAGGCCAG	10 906 488	11	Экзон 11 начало	chr16:10906485-10906505
G018076	56	51,45	6,29	CACCGGCUCUGCAAAGGCCA	10 906 489	10	Экзон 11 начало	chr16:10906486-10906506
G018077	57	55,90	0,14	CCACCGGCUCUGCAAAGGCC	10 906 490	9	Экзон 11 начало	chr16:10906487-10906507
G018078	58	83,65	3,04	CUGCUCCACCGGCUCUGCAA	10 906 495	4	Экзон 11 начало	chr16:10906492-10906512
G018079	59	19,25	2,62	UCAGCUGUGUCACCCGUUUC	10 908 145	4	Экзон 11 конец	chr16:10908127-10908147
G018080	60	63,90	4,53	GCUGUGUCACCCGUUUCAGG	10 908 148	1	Экзон 11 конец	chr16:10908130-10908150
G018081	61	91,10	0,42	CUGUGUCACCCGUUUCAGGU	10 908 149	-	Экзон 11 конец	chr16:10908131-10908151
G018082	62	93,60	2,26	UGUGUCACCCGUUUCAGGUG	10 908 150	(1)	Экзон 11 конец	chr16:10908132-10908152
G018083	63	21,50	2,97	CACCCGUUUCAG	10 908 155	(6)	Экзон 11	chr16:10908137-10908157

				GUGGGGUG			конец	
G018084	64	44,00	3,39	ACCCGUUUCAGGUGGGGUGA	10 908 156	(7)	Экзон 11 конец	chr16:10908138-10908158
G018085	65	32,95	0,92	CCCGUUUCAGGUGGGGUGAG	10 908 157	(8)	Экзон 11 конец	chr16:10908139-10908159
G018086	66	83,30	4,38	GUCUGAGGCCCUCCCUCCAC	10 909 024	5	Экзон 12 начало	chr16:10909006-10909026
G018087	67	67,95	2,76	UCUGAGGCCCUCCCUCCACA	10 909 025	4	Экзон 12 начало	chr16:10909007-10909027
G018088	68	61,70	0,14	CAAGGCAGCCCUGUGGAGGG	10 909 021	8	Экзон 12 начало	chr16:10909018-10909038
G018089	69	26,10	0,28	GCUCAAGGCAGCCCUGUGGA	10 909 024	5	Экзон 12 начало	chr16:10909021-10909041
G018090	70	86,75	0,07	CGCUCAAGGCAGCCCUGUGG	10 909 025	4	Экзон 12 начало	chr16:10909022-10909042
G018091	71	84,20	1,56	UGUGCAGACUCAGAGGUGAG	10 909 190	(3)	Экзон 12 конец	chr16:10909172-10909192

G018092	72	39,65	8,98	UAACAUUGCCUGUUCUCUCC	10 910 183	5	Экзон 13 начало	chr16:10910165-10910185
G018093	73	29,55	5,59	CUUCUCGUCCUGGAGAGAAC	10 910 179	9	Экзон 13 начало	chr16:10910176-10910196
G018094	74	70,65	11,24	UUCCGAGGAACUUCUCGUCC	10 910 189	(1)	Экзон 13 начало	chr16:10910186-10910206
G018095	75	41,25	0,50	ACCCUUGCUCUUUGCCUCCU	10 915 565	5	Экзон 14 начало	chr16:10915547-10915567
G018096	76	24,35	4,03	UUGCUCUUUGCCUCCUAGGC	10 915 569	1	Экзон 14 начало	chr16:10915551-10915571
G018097	77	55,05	8,98	UGCUCUUUGCCUCCUAGGCU	10 915 570	-	Экзон 14 начало	chr16:10915552-10915572
G018098	78	33,60	2,55	CCUGAGACAGGGCCCAGCCU	10 915 570	-	Экзон 14 начало	chr16:10915567-10915587
G018099	79	72,60	1,41	AUCUGAUUCCACCUGCAGCC	10 916 366	1	Экзон 15 начало	chr16:10916348-10916368
G018100	80	62,90	5,37	CAGCGCAUCCAG	10 916 362	5	Экзон 15	chr16:10916359-10916379

				GCUGCAGG			начало	
G018101	81	85,70	4,38	ACUCAGCGCAUCCAGGCUGC	10 916 365	2	Экзон 15 начало	chr16:10916362-10916382
G018102	82	55,75	5,59	AAACCCUCAAGUGAGUGAGC	10 916 467	(8)	Экзон 15 конец	chr16:10916449-10916469
G018103	83	28,00	0,57	AACCCUCAAGUGAGUGAGCU	10 916 468	(9)	Экзон 15 конец	chr16:10916450-10916470
G018104	84	85,30	8,34	GGCCCAGCUCACUCACUUGA	10 916 458	1	Экзон 15 конец	chr16:10916455-10916475
G018105	85	89,90	1,70	AGGCCCAGCUCACUCACUUG	10 916 459	-	Экзон 15 конец	chr16:10916456-10916476
G018106	86	30,25	2,05	CAGACUGCGGGGACACAGUG	10 918 426	14	Экзон 16 начало	chr16:10918423-10918443
G018107	87	89,90	0,28	CUGCAUCCCUGCUCAGGCUA	10 918 522	4	Экзон 16 конец	chr16:10918504-10918524
G018108	88	86,10	6,22	CCUGCUCAGGCUAAGGUGAG	10 918 529	(3)	Экзон 16 конец	chr16:10918511-10918531

G018109	89	86,55	2,19	CUGCUCAGGCUAAGGUGAGU	10 918 530	(4)	Экзон 16 конец	chr16:10918512-10918532
G018110	90	31,30	5,52	CAGCACCUGACCGGUAUCCG	10 918 542	(16)	Экзон 16 конец	chr16:10918539-10918559
G018111	91	26,65	2,76	GUACAAGCUGUCGGAAACAG	10 922 156	11	Экзон 17 начало	chr16:10922153-10922173
G018112	92	81,95	2,33	GGAGACGCUGGCGUAAGUCC	10 922 496	(6)	Экзон 18 конец	chr16:10922478-10922498
G018113	93	22,50	0,85	GGCGUAAGUCCAGGCAACCC	10 922 505	(15)	Экзон 18 конец	chr16:10922487-10922507
G018114	94	36,05	4,74	CUCCACCCACCAGGGUUGCC	10 922 502	(12)	Экзон 18 конец	chr16:10922499-10922519
G018115	95	31,40	4,67	UGAGUCCCAUCCCCCCUUGC	10 923 223	5	Экзон 19 начало	chr16:10923205-10923225
G018116	96	22,80	1,84	CCACAUCCUGCAAGGGGGGA	10 923 217	11	Экзон 19 начало	chr16:10923214-10923234
G018117	97	34,50	3,82	GCGUCCACAUCC	10 923 221	7	Экзон 19	chr16:10923218-10923238

				UGCAAGGG			начало	
G018118	98	43,30	3,82	GGCGUCCACAUCCUGCAAGG	10 923 222	6	Экзон 19 начало	chr16:10923219-10923239
G018119	99	25,35	1,77	GGGCGUCCACAUCCUGCAAG	10 923 223	5	Экзон 19 начало	chr16:10923220-10923240
G018120	100	62,60	4,24	UGGGCGUCCACAUCCUGCAA	10 923 224	4	Экзон 19 начало	chr16:10923221-10923241
G018121	101	35,35	4,46	GUGGGCGUCCACAUCCUGCA	10 923 225	3	Экзон 19 начало	chr16:10923222-10923242
Без направляющей (только клетки)	105	22,95	1,20					
G000529 (Контроль 1)	700	26,40	2,69	GGCCACGGAGCGAGACAUCU				chr15:44711544-44711564
G010036 (Контроль 2)	107	20,00	2,97	ACACAAAUACCAGUCCAGCG				chr18:50681533-50681553

Таблица 4B- NGS-анализ CIITA.

Идентификатор направляющей послед-ти	**Seq ID NO**	**Набор праймеров 1**		**Набор праймеров 2**	
		Средний % редакт.	**СО % редакт.**	**Средний % редакт.**	**СО % редакт.**

G018021	1	56,80	14,28	48,55	7,85
G018022	2	43,45	2,76	29,85	5,30
G018023	3	68,55	5,44	32,30	0,85
G018024	4			26,65	2,05
G018025	5	57,00	2,55	31,75	1,06
G018026	6	50,40	0,42	38,65	6,72
G018027	7	39,00	14,00	25,40	0,14
G018028	8	28,45	8,84	29,75	5,44
G018029	9			9,35	1,20
G018030	10			21,65	1,48
G018031	11			18,65	3,46
G018032	12			9,65	2,62
G018033	13	35,80		30,40	1,27
G018034	14	46,05	23,69	57,05	2,90
G018035	15	48,15	14,21	48,55	8,41
G018036	16	46,75	19,02		
G018037	17			50,15	13,08
G018038	18			44,40	21,92
G018039	19			45,00	21,92
G018040	20	7,95	5,16	5,10	3,54
G018041	21	23,85	13,51	9,60	6,51
G018042	22	52,10	18,67	38,75	13,79
G018043	23	41,10	5,09	16,35	7,57
G018044	24	72,45	4,74	19,15	12,80
G018045	25	25,70	11,46	27,70	6,65
G018046	26	39,50	24,61	30,65	13,36
G018047	27	36,10	22,63	23,25	8,27
G018048	28			32,75	15,34
G018049	29			38,05	6,15
G018050	30			35,95	0,35
G018051	31			28,60	3,82
G018052	32			40,45	4,03
G018053	33			38,20	8,06
G018054	34	48,30	12,30	39,40	5,37

G018055	35	59,20		46,50	7,64
G018056	36	66,50		36,15	15,63
G018057	37	37,20		32,80	12,02
G018058	38			56,00	12,30
G018059	39			6,35	2,47
G018060	40			48,35	9,26
G018061	41	45,15	20,29	50,65	6,86
G018062	42	45,75	11,24	37,90	9,76
G018063	43	40,00	9,76	34,65	1,20
G018064	44	58,30	0,99	50,75	0,92
G018065	45	52,95	7,99	49,75	0,21
G018066	46	51,55	15,77	47,65	2,05
G018067	47	63,30		32,40	13,01
G018068	48	45,75	7,14	40,75	1,63
G018069	49	51,20	3,96	45,40	2,69
G018070	50	37,85	13,79	49,00	4,95
G018071	51	24,20		9,50	13,44
G018072	52	41,30			
G018073	53	31,05	2,19	43,20	2,40
G018074	54	29,05	12,09	29,00	3,39
G018075	55	31,30		30,75	7,85
G018076	56	34,30	3,54	32,40	2,97
G018077	57	32,00	10,89	33,55	1,34
G018078	58	38,05	7,42	38,30	9,48
G018079	59	0,10	0,00	0,10	0,00
G018080	60	25,30	2,12	29,75	1,34
G018081	61	24,80	19,23	15,95	2,47
G018082	62	27,05	20,44	18,55	7,28
G018083	63			0,35	0,07
G018084	64	30,30	17,39	20,35	1,77
G018085	65	37,80	26,16	22,70	8,49
G018086	66	36,90	26,02	39,35	6,01
G018087	67	46,95	19,87	41,15	2,47
G018088	68	27,50	0,57	34,40	0,00

G018089	69	70,75	23,55	60,70	6,08
G018090	70	49,85	29,63	35,05	4,17
G018091	71	62,70	23,76	0,00	
G018092	72	11,25	0,49		
G018093	73	12,15	4,03		
G018094	74	18,40	15,84		
G018095	75	6,35	8,98		
G018096	76	1,55	0,35		
G018097	77	15,60	1,27		
G018098	78	12,30	3,11		
G018099	79	36,60	8,34		
G018100	80				
G018101	81	0,00	0,00		
G018102	82	4,00	1,84		
G018103	83	6,45	0,78		
G018104	84	27,40	0,28		
G018105	85	37,30	25,88		
G018106	86	14,65	1,48		
G018107	87	22,00	19,66		
G018108	88	10,65	5,73		
G018109	89	63,50	8,91		
G018110	90	33,45	16,62		
G018111	91	19,50	5,66		
G018112	92	30,85	0,21		
G018113	93				
G018114	94	6,70	5,09		
G018115	95	0,00	0,00		
G018116	96				
G018117	97				
G018118	98				
G018119	99				
G018120	100				
G018121	101				
G000529	700	43,30			

G010036	107				

Пример 3. Скрининг CIITA-направленных РНК с использованием BC22

[00421] CIITA-направленные РНК подвергали скринингу с использованием BC22, нуклеазы-редактора преобразования оснований, которая включает слияние никазы Cas9D10A, дезаминазы APOBEC3A человека и ингибитора урацилгликозилазы. Характерным изменением этой конструкции является превращение цитозина в тимин, а не индел, типичный для кливазы Cas9. Эффективность в Т-клетках оценивали по потере экспрессии на поверхности клеток MHC класса II. Процент Т-клеток, отрицательных по белку MHC класса II, анализировали после редактирования CIITA путем электропорации с мРНК и направляющей.

3.1. Электропорация мРНК Т-клеток.

[00422] После размораживания Т-клетки Pan CD3+, выделенные из коммерчески полученного лейкопака (StemCell), высевали с плотностью $0,5\times10^6$ клеток/мл в среду 20 из **Таблицы 3**. Т-клетки активировали с помощью Dynabeads® Human T-Activator CD3/CD28 (ThermoFisher). Клетки размножали в среде для Т-клеток в течении 72 часов до трансфекции мРНК.

[00423] CIITA-онРНК (**Таблица 4A**) удаляли из планшетов для хранения и денатурировали в течение 2 минут при 95°C перед охлаждением при комнатной температуре в течение 10 минут. Пятьдесят микролитров смеси для электропорации готовили из 100,00 Т-клеток в буфере P3 (Lonza) и 10 нг/мкл мРНК, кодирующей UGI (SEQ ID No. 807), 10 нг/мкл мРНК, кодирующей BC22 (SEQ ID No. 806) и 2 мкМ онРНК. Эту смесь переносили в соответствующие лунки 96-луночного планшета для электропорации Lonza Shuttle. Клетки подвергали электропорации в дублирующихся лунках с использованием Lonza Shuttle 96w, используя импульсный код производителя. Среду 20 добавляли к клеткам сразу после электропорации. Затем электропорированные Т-клетки культивировали и собирали для NGS-секвенирования и проточной цитометрии через 10 дней после редактирования. Проточную цитометрию проводили, как описано в **Примере 2**. Образцы ДНК подвергали ПЦР и последующему NGS-анализу, как описано в **Примере 1**.

[00424] **В Таблице 5** показан средний процент Т-клеток, отрицательных в отношении экспрессии MHC класса II на клеточной поверхности, а также средний процент редактирования.

[00425] **Таблица 5: Скрининг CIITA-направленной РНК с использованием BC22.**

Направляющая	**SEQ ID NO**	**Средний % отрицательных по MHC класса II**	**CO**	**Средний % редактирования C-на-T**	**CO**
G018021	1	38,65	0,21	87,55	0,21

G018022	2	23,05	0,64	88,15	0,64
G018023	3	25,00	0,71	84,05	0,78
G018024	4	24,85	1,63	87,20	0,57
G018025	5	23,05	2,76	84,95	0,92
G018026	6	35,65	2,90	71,00	0,71
G018027	7	30,65	1,06	75,00	0,85
G018028	8	25,20	3,11	75,50	0,71
G018029	9	24,00	0,28	5,70	0,57
G018030	10	24,60	0,00	38,65	1,77
G018031	11	22,85	0,07	59,70	4,38
G018032	12	20,15	1,63	21,75	0,21
G018033	13	21,05	1,34	64,85	1,06
G018034	14	72,90	2,69	74,00	1,13
G018035	15	47,00	0,28	73,70	0,28
G018036	16	22,90	0,28	36,25	0,78
G018037	17	21,90	2,26	49,30	2,26
G018038	18	20,90	1,84	58,00	6,65
G018039	19	62,55	4,60	67,45	2,05
G018040	20	20,15	2,62	11,60	0,14
G018041	21	22,25	2,33	17,15	0,49
G018042	22	34,80	0,28	47,25	0,78
G018043	23	31,20	2,97	36,15	0,78
G018044	24	33,15	1,34	31,65	0,92
G018045	25	22,75	1,20	66,35	1,20
G018046	26	31,65	5,44	79,10	1,70
G018047	27	28,20	4,38	75,55	0,35
G018048	28	41,00	2,83	64,75	1,34
G018049	29	28,95	4,17	53,25	1,48
G018050	30	31,00	3,11	75,35	0,78
G018051	31	27,90	4,10	50,80	
G018052	32	20,90	1,27	74,25	0,78
G018053	33	21,75	0,92	52,90	1,41
G018054	34	39,95	0,21	82,50	0,57
G018055	35	23,50	2,97	71,25	0,92

G018056	36	24,85	2,05	77,20	3,11
G018057	37	23,30	0,99	68,55	1,06
G018058	38	25,45	0,64	67,15	0,78
G018059	39	24,55	0,49	4,80	
G018060	40	22,50	2,26	91,65	0,64
G018061	41	22,50	0,71	73,60	0,57
G018062	42	24,65	0,07	72,75	0,78
G018063	43	34,80	0,14	68,85	0,49
G018064	44	24,95	2,33	76,75	2,62
G018065	45	26,60	0,71	70,35	0,07
G018066	46	24,35	4,88	70,65	0,35
G018067	47	86,65	1,20	83,80	0,42
G018068	48	50,50	2,55	82,10	0,14
G018069	49	24,50	1,98	83,95	0,21
G018070	50	25,55	0,64	82,35	0,49
G018071	51	32,25	0,49	70,40	0,28
G018072	52	23,65	3,32	74,45	1,63
G018073	53	22,65	2,76	75,90	1,84
G018074	54	21,60	2,97	50,50	0,99
G018075	55	88,30	1,56	87,05	0,07
G018076	56	88,45	0,64	87,45	0,35
G018077	57	69,15	2,47	78,65	1,48
G018078	58	71,35	4,17	88,35	0,64
G018079	59	39,15	8,27	73,75	1,34
G018080	60	32,85	0,07	57,45	1,77
G018081	61	37,90	1,27	77,30	3,82
G018082	62	36,75	1,91	77,05	3,18
G018083	63	37,65	1,06	49,50	0,71
G018084	64	45,25	3,75	77,35	0,49
G018085	65	45,75	2,19	75,00	1,13
G018086	66	18,85	1,06	77,85	0,21
G018087	67	18,45	2,05	77,00	1,56
G018088	68	42,20	4,38	90,10	0,28
G018089	69	34,30	3,25	88,70	1,41

G018090	70	39,70	3,39	90,20	0,28
G018091	71	85,60	1,56	82,30	1,13
G018092	72	26,70	3,96	56,65	0,78
G018093	73	74,05	1,48	80,95	1,63
G018094	74	36,10	1,41	72,25	0,92
G018095	75	25,75	3,46	91,70	1,27
G018096	76	27,15	3,32	16,60	1,13
G018097	77	28,90	1,70	49,40	0,28
G018098	78	28,40	0,57	16,65	2,76
G018099	79	26,75	0,64	84,50	1,13
G018100	80	87,80	0,00	85,05	0,49
G018101	81	81,10	2,26	85,50	4,53
G018102	82	72,25	0,35	64,50	0,71
G018103	83	80,90	1,56	71,50	0,14
G018104	84	26,00	4,53	82,95	1,77
G018105	85	24,85	1,48	86,30	0,14
G018106	86	85,25	1,20	81,40	2,26
G018107	87	94,33	0,06	87,10	0,99
G018108	88	55,25	0,64	85,75	1,63
G018109	89	44,40	0,71	84,85	0,64
G018110	90	26,05	0,49	76,15	2,19
G018111	91	81,55	0,07	83,35	0,49
G018112	92	33,05	1,91	75,30	1,41
G018113	93	32,85	1,06	80,25	3,32
G018114	94	33,60	3,54	64,40	1,84
G018115	95	23,95	2,05	55,45	2,33
G018116	96	68,10	2,12	53,30	2,26
G018117	97	93,25	0,20	86,10	0,71
G018118	98	92,96	0,42	84,00	0,14
G018119	99	57,80	2,12	44,60	2,69
G018120	100	89,40	0,28	84,15	1,91
G018121	101	75,85	0,49	75,00	0,99

3,4. Положение направляющей по сравнению с нокдауном белка MHC класса II

[00426] **В Таблице 6** и **на Фиг. 2** показан процент нокаута MHC класса II с

использованием Cas9 и BC22 в зависимости от расстояния от сайта разреза до нуклеотида, граничащего в сайтом сплайсинга.

[00427] Для каждой направляющей показаны геномные координаты сайта разреза с помощью spCas9, а также расстояние (количество нуклеотидов) между нуклеотидом, граничащим с акцепторным сайтом сплайсинга, или нуклеотидом, граничащим с донорным сайтом сплайсинга, и сайтом разреза. Положительные числовые значения показывают количество нуклеотидов в 5'-направлении между нуклеотидом, граничащим с сайтом сплайсинга, и сайтом разреза, тогда как отрицательные числовые значения показывают количество нуклеотидов в 3'-направлении между нуклеотидом, граничащим с сайтом сплайсинга, и сайтом разреза.

[00428] **Таблица 6: Положение направляющей в зависимости от эффективности нокдауна белка**

Направляющая	Расстояние от сайта разреза (п.н.)	BC22		Cas9	
		Средний % отрицательных по MHC класса II	CO	Средний % отрицательных по MHC класса II	CO
G018075	11	88,3	1,56	54,7	3,54
G018076	10	88,45	0,64	51,45	6,29
G018077	9	69,15	2,48	55,9	0,14
G018078	4	71,35	4,17	83,65	3,04
G018081	0	37,9	1,27	91,1	0,42
G018082	-1	36,75	1,91	93,6	2,26
G018084	-7	45,25	3,75	44	3,39
G018085	-8	45,75	2,19	32,95	0,92

Пример 4. Редактирование в Т-клетках с помощью UGI в транс.

4.1 Редактирование Т-клеток

[00429] Т-клетки редактировали в локусе CIITA с UGI в транс и либо BC22n, либо Cas9, чтобы оценить влияние типа редактирования на антигены MHC класса II. BC22n представляет собой нуклеазу-редактор преобразования оснований, которая включает слияние никазы Cas9D10A и дезаминазы APOBEC3A человека. Характерным изменением этой конструкции является превращение цитозина в тимин, а не индел, типичный для кливазы Cas9.

[00430] Аферез здоровых доноров был получен коммерчески (Hemacare), клетки были промыты и ресуспендированы в буфере ФСБ/ЭДТА CliniMACS® (Miltenyi Biotec, кат. № 130-070-525) на устройстве LOVO. Т-клетки выделяли с помощью положительной селекции с использованием магнитных гранул с CD4 и CD8 (Miltenyi Biotec кат. № 130-030-401/130-030-801) с использованием одноразовых наборов CliniMACS® Plus и

CliniMACS® LS. Т-клетки были разделены на аликвоты во флаконы и криоконсервированы в составе 1:1 Cryostor® CS10 (StemCell Technologies, кат. № 07930) и Plasmalyte A (Baxter, кат. № 2B2522X) для будущего использования.После размораживания Т-клетки высевали с плотностью $1,0\times10^6$ клеток/мл в основную среду для Т-клеток, состоящую из среды для гемопоэтических клеток без сыворотки X-VIVO 15™ (Lonza Bioscience), содержащей 5% (об./об.) фетальной бычьей сыворотки, 50 мкМ 2-меркаптоэтанола, 10 мМ N-ацетил-L-(+)-цистеина, 10 ЕД/мл пенициллин-стрептомицина, в дополнение к 1X цитокинов (200 ЕД/мл рекомбинантного интерлейкина-2 человека, 5 мкг/мл рекомбинантного интерлейкина-7 человека и 5 мкг/мл рекомбинантного интерлейкина-15 человека). Т-клетки активировали с помощью TransAct™ (разведение 1:100, Miltenyi Biotec). Клетки размножали в основной среде для Т-клеток, содержащей TransAct™, в течение 72 часов перед электропорацией.

4.2. Электропорация Т-клеток

[00431] Растворы, содержащие мРНК, кодирующие Cas9, BC22n (SEQ ID NO:804) или UGI (SEQ ID NO:807), готовили в стерильной воде. 50 мкМ СПТА-онРНК (G018076 и G018117) (SEQ ID NO: 56 и 97, соответственно) удаляли из их планшетов для хранения и денатурировали в течение 2 минут при 95°C перед охлаждением на льду. Через семьдесят два часа после активации Т-клетки собирали, центрифугировали и ресуспендировали в концентрации $12,5\times10^6$ Т-клеток/мл в буфере для электропорации P3 (Lonza). В каждой лунке для электропорации 1×10^5 Т-клеток смешивали с 200 нг мРНК редактора, 200 нг мРНК UGI и 20 пмоль онРНК в конечном объеме 20 мкл буфера для электропорации P3. Эту смесь в трех повторностях переносили на 96-луночный планшет Nucleofector™ и подвергали электропорации, используя импульсный код производителя. Электропорированные Т-клетки немедленно выдерживали в 80 мкл основной среды для Т-клеток без цитокинов в течение 10 минут, а затем переносили в новый плоскодонный 96-луночный планшет, содержащий дополнительные 100 мкл основной среды для Т-клеток с добавлением 2X цитокинов. Полученный планшет инкубировали при 37°C в течение 4 дней. Через 96 часов Т-клетки разбавляли 1:3 свежей основной средой для Т-клеток с 1X цитокинами. Затем электропорированные Т-клетки культивировали в течение 3 дополнительных дней и собирали для анализа проточной цитометрии, NGS-секвенирования и транскриптомики. NGS-анализ проводили, как описано в Примере 1.

4.3. Проточная цитометрия и NGS-секвенирование.

[00432] На 7-й день после редактирования Т-клетки фенотипировали с помощью проточной цитометрии для определения экспрессии белка MHC класса II. Вкратце, Т-клетки инкубировали в коктейле антител, нацеленных на HLA-DR, DQ, DP-PE (BioLegend® кат. № 361704), и с изотипическим контролем-PE (BioLegend® кат. № 400234). Затем клетки промывали, обрабатывали на проточном цитометре Cytoflex (Beckman Coulter) и анализировали с использованием пакета программного обеспечения FlowJo. Т-клетки были отобраны на основе размера, формы, жизнеспособности и экспрессии MHC класса II. Образцы ДНК подвергали ПЦР и последующему NGS-анализу,

как описано в Примере 1. В **Таблице** 7 и на **Фиг. 1A, 1B и 6A** показано редактирование гена CIITA. Как для условий Cas9, так и для условий BC22n полное редактирование почти завершилось, превысив 95%. **В Таблице** 7 и на **Фиг. 1C, 1D и 6B** показан средний процент клеток, отрицательных по MHC класса II, после электропорации мРНК UGI в сочетании с мРНК Cas9 или BC22n.

[00433] **Таблица 7. Редактирование CIITA в Т-клетках, представленное в процентах от общего количества NGS-считываний; Проточная цитометрия оценивает средний процент отрицательных по MHC класса II.**

Редактор	Направляющая	% C-на-T		% C-на-A/G		% инделов		% отр. по MHC класса II		
		Среднее	CO	Среднее	CO	Среднее	CO	Среднее	CO	N
Cas9	G018117	0,0	0,0	0,1	0,0	98,0	0,2	70,3	1,5	3
	G018118	0,0	0,0	0,1	0,1	97,5	0,5	73,7	0,5	3
	G018120	0,1	0,1	0,2	0,0	92,3	0,3	83,1	1,1	3
	G018076	0,0	0,0	0,1	0,0	98,3	0,1	62,8	1,1	3
	G018100	0,0	0,0	0,1	0,0	98,9	0,2	84,1	1,3	3
	G018091	0,0	0,0	0,0	0,0	99,4	0,2	96,2	0,4	3
	Без направляющей	Не сообщалось						10,5	0,0	1
BC22n	G018117	95,7	0,2	2,3	0,1	1,1	0,1	99,2	0,1	3
	G018118	95,8	0,3	2,3	0,1	1,2	0,3	99,0	0,1	3
	G018120	95,7	0,5	2,6	0,4	0,7	0,1	99,0	0,1	3
	G018076	96,5	0,4	1,2	0,2	1,1	0,3	98,5	0,2	3
	G018100	90,7	0,3	2,8	0,3	5,1	0,7	95,7	0,6	3
	G018091	95,4	0,6	2,8	0,1	1,1	0,3	98,7	0,2	3
	Без направляющей	Не сообщалось						10,8	0,0	1

Пример 5**.** Анализ экспрессии генов в Т-клетках.

5.1. Полное секвенирование транскриптома.

[00434] На день 7 после редактирования Т-клетки, обработанные G018117 (SEQ ID NO: 97) и G018078 (SEQ ID NO: 58) в примере 4, собирали и сохраняли при -80°C для дальнейшей обработки. Общую РНК экстрагировали из образцов в реагенте TRIzol™ с

использованием набора для выделения РНК Direct-zol RNA microprep (Zymo Research, кат. № R2062) в соответствии с протоколом производителя. Очищенные образцы РНК количественно определяли на спектрофотометре NanoDrop™ 8000 (Thermo Fisher Scientific) и разбавляли до 41,67 нг/мкл водой, не содержащей нуклеаз. Из каждой из трех экспериментальных повторностей, показанных на **Фиг. 1**, для транскриптомного анализа случайным образом отбирали по две пробы на группу. 500 нг (12 мкл) очищенной общей РНК истощали по компонентам рибосомной РНК (рРНК) с использованием набора NEBNext® rRNA Depletion Kit (New England Biolabs, кат. № E6350L) в соответствии с инструкциями производителя. Истощенные по рРНК образцы были преобразованы в библиотеки двухцепочечной ДНК с использованием набора РНК NEBNext® Ultra™ II Directional RNA Library Prep Kit для Illumina® (New England Biolabs, кат. № E7765S) в соответствии с протоколом производителя. Амплифицированные библиотеки количественно определяли на флуорометре Qubit 4 и определяли средний размер фрагмента каждой библиотеки с помощью капиллярного электрофореза. Библиотеки объединяли в эквимолярной концентрации 4 нМ и секвенировали со спаренными концами с использованием высокопроизводительного набора на 300 циклов (Illumina, кат. № 20024908) на платформе для секвенирования NextSeq550 (Illumina).

5.2. Обработка данных для дифференциального анализа экспрессии генов.

[00435] Считывания секвенирования в формате FASTQ были сгенерированы и демультиплексированы с использованием программы bcl2fastq (Illumina, v2.20). Считывания были отнесены к образцу, если расстояние Хэмминга (Хемминг, R.W. Bell Syst. Tech. J. 29, 147-160) между каждым индексом считывания и индексами образца было меньше или равно единице. Качество секвенирования проверяли с помощью программы FastQC (v0.11.9) (Andrews S. Babraham Inst.). Считывания рибосомной РНК идентифицировали путем сопоставления всех считываний с последовательностями рРНК человека (GenBank U13369.1) с Bowtie2 (v2.3.5.1) (Langmead, B. and Salzberg, S.L. Nat. Methods 9, 357-359). Количественную оценку транскриптома проводили с использованием Salmon (v0.14.1) (Patro R., et al. Nat. Methods 14, 417-419) с считываниями нерибосомных РНК. Дифференциальный анализ экспрессии генов проводили с использованием DESeq2 (v1.26.0) (Love, M.I., et al. Genome Biol. 15, 550) на продуктах выхода Salmon. Было определено, что гены или транскрипты с скорректированным p-значением Бенджамина-Хохберга менее 0,05 имеют дифференциальную экспрессию. Списки дифференциально экспрессируемых генов анализировали с точки зрения онтологии генов с использованием Metascape (Zhou, Y., et al. Nat. Comm. 10, 1523). Белок-белковые взаимодействия определяли с использованием баз данных BioGrid, InWeb_IM и OmniPath8 (Li, T., et al. Nat. Methods 14, 61-64; Stark, C., et al. Nucleic Acids Res. 34, 535-539; Türei, D., et al. Nat. Methods 13, 966-967). Плотно связанные сети были идентифицированы с использованием алгоритма обнаружения молекулярных комплексов (MCODE) (Bader, G.D., et al. BMC Bioinformatics 4, 1-27), и три члена с наилучшей оценкой по p-значению были сохранены в качестве функционального описания соответствующих компонентов сети.

[00436] По сравнению с образцами, обработанными мРНК, кодирующей Cas9 (SEQ ID NO: 809), Т-клетки, подвергнутые электропорации мРНК BC22n (SEQ ID NO: 806), демонстрировали значительно более сильное подавление генов MHC класса II и HLA-ассоциированного гена CD74 (**Таблица 8** и **Таблица 9**). Наблюдали минимальное влияние на гены MHC класса I (**Таблица 10** и **Таблица 11**). Что касается событий дифференциальной экспрессии генов по всему транскриптому, обработка мРНК BC22n приводила к меньшему количеству дифференциально экспрессируемых генов (скорректированное p-значение <0,05) по сравнению с мРНК Cas9. В Т-клетках, подвергнутых электропорации онРНК G018076 (SEQ ID NO: 56), наблюдали в общей сложности 553 и 65 событий дифференциальной экспрессии генов при обработке мРНК Cas9 и BC22n, соответственно (**Фиг. 7A и 7B**). Аналогичная тенденция наблюдалась в Т-клетках, подвергнутых электропорации онРНК G018117 (SEQ ID NO: 97), которые демонстрировали 303 и 30 событий дифференциальной экспрессии генов при обработке мРНК Cas9 и BC22n, соответственно (**Фиг. 7C и 7D**). Среди дифференциально экспрессируемых генов в Т-клетках, обработанных мРНК BC22n, было выявлено меньше сетей белок-белковых взаимодействий, по сравнению с клетками, обработанными мРНК Cas9 с онРНК G018076 (SEQ ID NO: 56) (**Фиг. 8A** (Cas9) и **8B** (BC22n)) и с онРНК G018117 (SEQ ID NO: 97) (**Фиг. 8C** (Cas9) и **8D** (BC22n)).

[00437] **Таблица 8. Дифференциальная экспрессия генов MHC класса II в Т-клетках.**

(нз=не значимо, *=p.скор.<0,05, **=p.скор.<0,01, ***=p.скор.<0,001). Данные количественного анализа транскриптов см. в Таблице 9.

	онРНК G018076				**онРНК G018117**			
	Cas9 в сравнении с контролем		**BC22n в сравнении с контролем**		**Cas9 в сравнении с контролем**		**BC22n в сравнении с контролем**	
Ген	**Кратность изменения**	**p. скор.**	**Кратность изменения**	**p. скор.**	**Кратность изменения**	**p. скор.**	**Кратность изменения**	**p. скор.**
CD74	0,446	***	0,116	***	0,360	***	0,100	***
HLA-DMA	0,457	***	0,150	***	0,356	***	0,146	***
HLA-DMB	0,363	***	0,113	***	0,267	***	0,091	***
HLA-DOA	0,450	***	0,299	***	0,420	***	0,280	***
HLA-DPA1	0,474	***	0,181	***	0,385	***	0,170	***
HLA-DPB1	0,381	***	0,087	***	0,300	***	0,073	***
HLA-DQA1	0,316	***	0,017	***	0,214	***	0,009	***

	онРНК G018076				онРНК G018117			
	Cas9 в сравнении с контролем		BC22n в сравнении с контролем		Cas9 в сравнении с контролем		BC22n в сравнении с контролем	
Ген	**Кратность изменения**	**р. скор.**	**Кратность изменения**	**р. скор.**	**Кратность изменения**	**р. скор.**	**Кратность изменения**	**р. скор.**
HLA-DQA2	0,215	***	0,007	***	0,221	***	0,011	***
HLA-DQB1	0,383	***	0,069	***	0,290	***	0,069	***
HLA-DQB1-AS1	0,323	***	0,102	***	0,311	***	0,097	***
HLA-DRA	0,288	***	0,004	***	0,205	***	0,002	***
HLA-DRB1	0,287	***	0,029	***	0,207	***	0,027	***
HLA-DRB3	0,268	***	0,012	***	0,219	***	0,004	***
HLA-DRB4	0,282	***	0,024	***	0,224	***	0,026	***

[00438] **Таблица 9. Количественная оценка экспрессии генов MHC класса II в Т-клетках.**

Каждый квадрат содержит среднее количество транскриптов данного гена на один миллион молекул мРНК. Статистическая значимость представлена в Таблице 8.

Направляющая	**отсутсвует**	**G0188117**		**G018076**	
мРНК	**UGI**	**Cas9 UGI**	**BC22n UGI**	**Cas9 UGI**	**BC22n UGI**
CD74	385	154	38	174	45
HLA-DMA	27	11	4	12	4
HLA-DMB	11	3	1	4	1
HLA-DOA	3	2	1	2	1
HLA-DPA1	70	30	12	34	13
HLA-DPB1	16	5	1	6	1
HLA-DQA1	12	3	0	4	0
HLA-DQA2	3	1	0	1	0
HLA-DQB1	60	19	4	23	4
HLA-DQB1-AS1	9	3	1	3	1
HLA-DRA	120	27	0	35	1
HLA-DRB1	117	27	3	34	3

HLA-DRB3	17	4	0	5	0
HLA-DRB4	13	3	0	4	0

[00439] **Таблица 10. Дифференциальная экспрессия генов HLA класса I в Т-клетках, собранных через 7 дней после обработки различными комбинациями мРНК и CIITA-онRNA.**

(нз=не значимо, *=р.скор.<0,05, **=р.скор.<0,01, ***=р.скор.<0,001). Данные количественного анализа транскриптов см. в Таблице 11.

	онРНК G018076				**онРНК G018117**			
	Cas9 в сравнении с контролем		**BC22n в сравнении с контролем**		**Cas9 в сравнении с контролем**		**BC22n в сравнении с контролем**	
Ген	**Кратность изменения**	**р. скор.**	**Кратность изменения**	**р. скор.**	**Кратность изменения**	**р. скор.**	**Кратность изменения**	**р. скор.**
HLA-A	0,995	нс	0,910	*	0,969	нс	0,926	нс
HLA-B	1,001	нс	0,881	**	1,043	нс	0,913	нс
HLA-C	1,013	нс	0,917	нс	0,995	нс	0,922	нс
HLA-E	0,925	нс	0,919	нс	0,870	***	0,949	нс
HLA-F	0,897	нс	0,812	**	0,930	нс	0,891	нс

[00440] **Таблица 11. Количественная оценка транскрипта экспрессии генов HLA класса I в Т-клетках.**

Каждый квадрат содержит среднее количество транскриптов данного гена на один миллион молекул мРНК. Статистическая значимость представлена в Таблице 12.

Направляющая	**отсутсвует**	**G0188117**		**G018076**	
мРНК	**UGI**	**Cas9 UGI**	**BC22n UGI**	**Cas9 UGI**	**BC22n UGI**
HLA-A	880	947	797	887	814
HLA-B	457	528	407	463	409
HLA-C	479	528	430	490	445
HLA-E	166	161	154	156	155
HLA-F	68	70	59	61	56

Пример 6. Титрование ЛНЧ в Т-клетках с фиксированным соотношением BC22n:UGI.

[00441] Используя доставку ЛНЧ к активированным Т-клеткам человека, эффективность одноцелевого и многоцелевого редактирования оценивали либо с

помощью Cas9, либо с BC22n.

6.1. Подготовка Т-клеток.

[00442] Аферез здоровых доноров был получен коммерчески (Hemacare), клетки были промыты и ресуспендированы в буфере ФСБ/ЭДТА CliniMACS® (Miltenyi Biotec, кат. № 130-070-525) на устройстве LOVO. Т-клетки выделяли с помощью положительной селекции с использованием магнитных гранул с CD4 и CD8 (Miltenyi Biotec кат. № 130-030-401/130-030-801) с использованием одноразовых наборов CliniMACS® Plus и CliniMACS® LS. Аликвоты Т-клеток распределяли по флаконам и криоконсервировали в составе Cryostor® CS10 в соотношении 1:1 (StemCell Technologies кат. № 07930) и Plasmalyte A (Baxter кат. № 2B2522X) для дальнейшего использования. После размораживания Т-клетки высевали с плотностью $1{,}0\times10^6$ клеток/мл в основную среду для Т-клеток, состоящую из среды для гемопоэтических клеток без сыворотки X-VIVO 15™ (Lonza Bioscience), содержащей 5% (об./об.) фетальной бычьей сыворотки, 50 мкМ 2-меркаптоэтанола, 10 мМ N-ацетил-L-(+)-цистеина, 10 ЕД/мл пенициллин-стрептомицина, в дополнение к 1X цитокинов (200 ЕД/мл рекомбинантного интерлейкина-2 человека, 5 мкг/мл рекомбинантного интерлейкина-7 человека и 5 мкг/мл рекомбинантного интерлейкина-15 человека). Т-клетки активировали с помощью TransAct™ (разведение 1:100, Miltenyi Biotec). Клетки размножали в основной среде для Т-клеток в течение 72 часов перед трансфекцией ЛНЧ.

6.2. Редактирование Т-клеток.

[00443] Каждый вид РНК, т.е. мРНК UGI, онРНК или мРНК редактора, готовили отдельно в ЛНЧ, как описано в Примере 1. мРНК редактора кодировали либо BC22n (SEQ ID NO: 805), либо Cas9. Направляющие, нацеленные на B2M (G015995) (SEQ ID NO: 704), TRAC (G016017) (SEQ ID NO: 705), TRBC1/2 (G016206) (SEQ ID NO: 706) и CIITA (G018117) (SEQ ID NO: 97), использовались как по отдельности, так и в комбинации. Информационная РНК, кодирующая UGI (SEQ ID NO: 807), доставляется как в Cas9, так и в BC22n ветви эксперимента для нормализации количества липидов. Предыдущие эксперименты установили, что мРНК UGI не влияет на общее редактирование или профиль редактирования при использовании с мРНК Cas9. ЛНЧ смешивали с фиксированной общей мРНК в массовом соотношении 6:3:2 для мРНК редактора, направляющей РНК и мРНК UGI соответственно, как описано в **Таблице 12**. В эксперименте с 4 направляющими, описанном в **Таблице 12**, отдельные направляющие разводили в 4 раза, чтобы сохранить общее массовое соотношение мРНК редактора:направляющая 6:3 и обеспечить возможность сравнения с эффективностью отдельной направляющей на основе общей доставки липидов. Смеси ЛНЧ инкубировали в течение 5 минут при 37°C в основной среде для Т-клеток с заменой 6% сыворотки яванского макака (Bioreclamation IVT, кат. № CYN220760) на фетальную бычью сыворотку.

[00444] Через семьдесят два часа после активации Т-клетки промывали и суспендировали в основной среде для Т-клеток. В каждую лунку добавляли

предварительно инкубированную смесь ЛНЧ в количестве 1×10e5 Т-клеток/лунка. Т-клетки инкубировали при 37°C с 5% CO2 в течение всего эксперимента. Среду для Т-клеток меняли через 6 дней и 8 дней после активации, а на десятый день после активации клетки собирали для анализа с помощью NGS и проточной цитометрии. NGS выполняли, как в **Примере 1**.

[00445] **Таблица 12** и **Фиг. 3A-D** описывают профиль редактирования Т-клеток, когда для редактирования использовалось отдельная направляющая. Полное редактирование и редактирование С на Т продемонстрировали прямую дозозависимую связь с увеличением количества мРНК BC22n, мРНК UGI и направляющей для всех исследованных направляющих. Индел и преобразование С в А или G находится в обратной зависимости от дозы, где более низкие дозы приводили к более высокому проценту этих мутаций. В образцах, отредактированных с помощью Cas9, общее редактирование и активность инделирования увеличиваются с увеличением общей дозы РНК.

[00446] **Таблица 12. Редактирование в процентах от общего числа считываний - доставка одиночной направляющей.**

Направляющая	**Редактор**	**Общая РНК (нг)**	**C-на-T %**		**C-на-A/G%**		**Индел %**		**N**
			среднее	**CO**	**среднее**	**CO**	**среднее**	**CO**	
G015995 B2M	BC22n	0,0	0,3	0,0	1,5	0,1	0,2	0,0	2
		8,6	49,5	3,5	7,7	0,6	6,0	0,4	2
		17,2	68,5	1,7	6,7	1,3	4,3	0,1	2
		34,4	79,0	0,9	5,7	0,3	3,8	0,0	2
		68,8	88,2	0,8	4,6	0,0	2,5	0,2	2
		137,5	90,6	1,8	4,1	0,4	2,2	0,5	2
		275,0	92,6	0,8	3,7	0,3	2,2	0,3	2
		550,0	95,2	0,4	2,8	0,0	1,6	0,2	2
	Cas9	0,0	0,3	0,0	1,5	0,2	0,2	0,0	2
		8,6	0,3	0,0	1,2	0,1	23,7	2,1	2
		17,2	0,3	0,0	0,9	0,1	41,1	0,2	2
		34,4	0,3	0,0	0,6	0,0	59,4	0,6	2
		68,8	0,2	0,1	0,4	0,0	76,8	1,2	2
		137,5	0,1	0,1	0,2	0,0	88,2	2,0	2
		275,0	0,1	0,0	0,1	0,1	95,1	0,5	2
		550,0	0,1	0,0	0,1	0,0	97,5	0,3	2
G016017	BC22n	0,0	0,2	0,0	2,2	0,1	0,2	0,1	2

TRAC		8,6	34,6	1,1	5,6	0,8	6,6	0,2	2
		17,2	51,3	0,8	5,7	0,1	6,7	1,0	2
		34,4	66,9	2,6	5,4	0,2	4,7	0,4	2
		68,8	79,0	0,6	4,4	0,7	4,5	0,9	2
		137,5	89,2	0,4	3,6	0,9	2,5	0,2	2
		275,0	92,8	0,9	2,9	0,0	2,3	0,0	2
		550,0	94,5	1,3	3,4	1,0	1,6	0,2	2
	Cas9	0,0	0,2	0,0	2,3	0,1	0,1	0,0	2
		8,6	0,2	0,0	2,1	0,2	20,7	0,5	2
		17,2	0,1	0,0	1,4	0,0	34,6	0,7	2
		34,4	0,1	0,0	1,5	0,4	49,8	0,4	2
		68,8	0,1	0,0	1,0	0,0	62,3	0,1	2
		137,5	0,1	0,0	0,6	0,1	77,0	0,1	2
		275,0	0,0	0,0	0,3	0,0	87,8	0,2	2
		550,0	0,0	0,0	0,2	0,0	93,8	0,6	2
G016206 TRBC1/2	BC22n	0,0	0,4	0,1	0,6	0,1	0,1	0,1	2
		8,6	23,7	1,3	6,1	0,0	6,1	0,8	2
		17,2	42,4	2,2	6,8	0,1	6,8	0,3	2
		34,4	60,1	2,2	5,7	0,3	5,9	0,7	2
		68,8	73,2	4,2	4,3	0,1	4,7	1,1	2
		137,5	81,7	0,8	3,6	0,2	3,7	0,4	2
		275,0	91,0	1,7	2,3	0,1	2,8	0,8	2
		550,0	93,6	1,9	2,0	0,2	1,7	0,6	2
	Cas9	0,0	0,3	0,0	0,5	0,0	0,1	0,0	1
		8,6	0,3	0,2	0,5	0,1	8,1	0,2	2
		17,2	0,3	0,1	0,7	0,1	14,9	0,6	2
		34,4	0,2	0,0	0,8	0,0	24,1	0,0	1
		68,8	0,2	0,0	0,4	0,0	35,9	0,0	1
		137,5	0,2	0,0	0,5	0,0	48,6	2,1	2
		275,0	0,1	0,0	0,4	0,0	63,8	0,0	1
		550,0	Не проанализировано						
G018117 CIITA	BC22n	0,0	0,3	0,0	2,7	0,1	0,3	0,0	2
		8,6	14,5	1,5	3,8	0,3	3,5	0,3	2
		17,2	28,1	0,6	3,5	0,3	3,9	1,0	2

		34,4	45,9	0,4	3,3	0,4	3,6	0,0	2
		68,8	62,8	5,3	3,6	0,1	3,7	1,2	2
		137,5	78,9	1,3	2,7	0,1	2,7	0,7	2
		275,0	86,3	1,8	2,6	0,1	2,0	0,1	2
		550,0	92,3	1,2	2,6	0,2	1,1	0,2	2
	Cas9	0,0	0,2	0,0	2,8	0,1	0,3	0,0	2
		8,6	0,3	0,0	2,5	0,0	6,0	0,2	2
		17,2	0,2	0,0	2,4	0,1	11,2	1,6	2
		34,4	0,2	0,0	2,1	0,0	20,8	0,3	2
		68,8	0,2	0,0	1,9	0,1	33,2	0,4	2
		137,5	0,1	0,0	1,3	0,1	51,2	0,0	2
		275,0	0,1	0,0	0,9	0,2	64,5	0,9	2
		550,0	0,1	0,0	0,6	0,0	78,4	1,1	2

[00447] **В Таблице 13** и **на Фиг. 4A-D** описывается профиль редактирования для Т-клеток в процентах от общего числа считываний, когда для редактирования одновременно использовались четыре направляющих. В этой ветви эксперимента каждую направляющую используют в концентрации 25% по сравнению с экспериментом по редактированию с одиночной направляющей. Всего на Т-клетки одновременно воздействовали 6 различных ЛНЧ (мРНК редактора, мРНК UGI, 4 направляющих). Редактирование с помощью BC22n и транс-UGI приводит к более высокому проценту максимального общего редактирования для каждого локуса по сравнению с редактированием с помощью Cas9.

[00448] **Таблица 13. Редактирование в процентах от общего числа считываний - доставка нескольких направляющих.**

Проанализированный локус	**Редактор**	**Общая РНК (нг)**	**С-на-Т %**		**С-на-A/G%**		**Индел %**		**N**
			среднее	**СО**	**среднее**	**СО**	**среднее**	**СО**	
G015995 B2M	BC22n	0,0	0,3	0,0	1,5	0,2	0,2	0,0	2
		8,6	27,3	0,2	3,8	0,1	2,6	0,1	2
		17,2	47,2	2,2	4,1	0,4	3,0	0,1	2
		34,4	61,2	3,0	3,9	0,1	2,6	0,3	2
		68,8	81,4	0,1	2,9	0,1	1,4	0,1	2
		137,5	90,0	1,1	2,6	0,3	1,3	0,5	2
		275,0	94,7	0,1	2,2	0,1	0,8	0,0	2
		550,0	95,9	0,9	2,9	1,0	0,4	0,3	2

	Cas9	0,0	0,3	0,0	1,4	0,1	0,2	0,0	2
		8,6	0,3	0,0	1,4	0,0	5,0	0,1	2
		17,2	0,3	0,0	1,3	0,0	10,5	0,4	2
		34,4	0,3	0,0	1,1	0,0	19,3	0,6	2
		68,8	0,3	0,0	0,9	0,0	34,4	0,1	2
		137,5	0,2	0,0	0,7	0,0	51,1	1,3	2
		275,0	0,2	0,1	0,5	0,0	68,0	0,1	2
		550,0	0,3	0,1	0,4	0,1	76,7	2,0	2
G016017 TRAC	BC22n	0,0	0,1	0,1	1,9	0,6	0,2	0,0	2
		8,6	12,1	1,3	4,3	0,2	2,4	0,2	2
		17,2	25,7	2,2	4,2	0,5	3,8	0,7	2
		34,4	44,7	1,4	4,7	1,0	3,0	0,3	2
		68,8	64,2	1,9	4,4	0,6	2,5	0,1	2
		137,5	79,3	1,1	3,6	0,4	2,1	0,1	2
		275,0	90,7	0,0	3,0	0,1	1,5	0,0	2
		550,0	93,3	0,6	2,4	0,1	0,9	0,4	2
	Cas9	0,0	0,1	0,1	2,1	0,2	0,1	0,0	2
		8,6	0,2	0,1	2,3	0,2	6,1	0,2	2
		17,2	0,1	0,0	1,8	0,2	11,5	0,5	2
		34,4	0,1	0,0	2,0	0,4	21,0	0,4	2
		68,8	0,1	0,0	1,4	0,0	33,5	0,1	2
		137,5	0,1	0,0	1,2	0,1	47,5	0,5	2
		275,0	0,1	0,0	0,9	0,1	64,8	0,2	2
		550,0	0,1	0,0	0,6	0,1	76,1	1,3	2
G016206 TRBC1/2	BC22n	0,0	Нет данных						
		8,6	11,6	0,3	2,6	0,2	2,8	0,3	2
		17,2	23,4	0,4	3,6	0,3	2,6	0,5	2
		34,4	38,5	1,4	3,7	0,2	2,9	0,7	2
		68,8	55,6	1,7	2,3	0,4	2,4	0,0	2
		137,5	72,4	1,2	1,8	0,5	1,7	0,5	2
		275,0	85,1	1,0	1,9	0,5	1,7	0,6	2
		550,0	89,8	2,8	2,2	0,1	0,9	0,3	2
	Cas9	0,0	0,2	0,0	0,6	0,0	0,1	0,0	1
		8,6	0,2	0,1	0,7	0,1	2,3	0,3	2

		17,2	0,3	0,0	0,7	0,3	4,2	0,4	2
		34,4	0,1	0,0	0,5	0,1	6,6	0,5	2
		68,8	0,4	0,0	0,5	0,0	12,3	0,0	1
		137,5	0,2	0,0	0,5	0,0	17,8	0,0	1
		275,0	0,1	0,0	0,5	0,0	33,0	0,0	1
		550,0	0,3	0,2	0,3	0,0	43,3	1,7	2
G018117 CIITA	BC22n	0,0	0,2	0,0	2,6	0,1	0,3	0,0	2
		8,6	4,6	0,9	3,1	0,2	0,8	0,2	2
		17,2	10,5	0,2	2,9	0,1	1,1	0,2	2
		34,4	18,8	0,3	2,9	0,2	1,6	0,2	2
		68,8	35,1	0,6	2,7	0,2	1,6	0,7	2
		137,5	52,9	0,2	2,9	0,3	1,5	0,0	2
		275,0	71,9	2,4	2,5	0,3	1,3	0,1	2
		550,0	81,1	1,9	2,6	0,1	1,1	0,6	2
	Cas9	0,0	0,3	0,0	2,7	0,1	0,3	0,0	2
		8,6	0,2	0,0	2,6	0,2	1,4	0,0	2
		17,2	0,2	0,0	2,5	0,0	2,1	0,3	2
		34,4	0,3	0,0	2,5	0,0	3,9	0,1	2
		68,8	0,2	0,0	2,5	0,2	7,7	0,6	2
		137,5	0,2	0,0	2,2	0,1	13,3	0,2	2
		275,0	0,1	0,0	1,9	0,0	26,7	1,3	2
		550,0	0,1	0,0	1,7	0,1	42,3	0,3	2

[00449] На 10-й день после активации Т-клетки фенотипировали с помощью проточной цитометрии, чтобы определить, приводит ли редактирование к потере белков на клеточной поверхности. Вкратце, Т-клетки инкубировали в смеси следующих антител: B2M-FITC (BioLegend, кат. № 316304), CD3-AF700 (BioLegend, кат. № 317322), HLA DR DQ DP-PE (BioLegend, кат. № 361704) и DAPI (BioLegend, кат. № 422801). Подмножество неотредактированных клеток инкубировали с изотипическим контролем-PE (BioLegend®, кат. № 400234). Затем клетки промывали, обрабатывали на приборе Cytoflex (Beckman Coulter) и анализировали с использованием программного пакета FlowJo. Т-клетки были отобраны на основе размера, формы, жизнеспособности и экспрессии антигена.

[00450] **В Таблице 14** и **на Фиг. 5A-H** представлены результаты фенотипирования в виде процента клеток, отрицательных в отношении связывания антител. Процент антиген-негативных клеток увеличивался дозозависимым образом с увеличением общей РНК как для образцов BC22n, так и для образцов Cas9. Клетки, отредактированные с помощью BC22n, показали сравнимый или более высокий нокаут белка по сравнению с

клетками, отредактированными с помощью Cas9, для всех исследованных направляющих. В мультиредактированных клетках BC22n с транс-UGI показали значительно более высокий процент антиген-негативных клеток, чем Cas9 с транс-UGI. Например, образцы, отредактированные с BC22n, при самой высокой дозе общей РНК 550 нг показали, что 84,2% клеток лишены всех трех антигенов, в то время как редактирование с Cas9 привело только к 46,8% таких клеток с тройным нокаутом. Для образцов, обработанных только одной направляющей, корреляция между редактированием ДНК и снижением антигена была надежной. BC22n имел значение R-квадрата 0,93 при сравнении превращений C в T с нокаутом антигена. Cas9 имел значение R-квадрата 0,95 при сравнении инделей с нокаутом антигена.

[00451] **Таблица 14. Данные проточной цитометрии - процент отрицательных по антигену клеток (n=2).**

Направляющая (ие)	**Фенотип**	**Общая РНК (нг)**	**BC22n**		**Cas9**	
			Средний %	**CO**	**Средний %**	**CO**
G015995 B2M	B2M-отриц.	550,0	95,7	0,1	91,3	0,6
		275,0	94,4	0,4	89,3	0,1
		137,5	91,2	0,1	82,1	3,3
		68,8	83,9	0,4	68,7	3,3
		34,4	75,7	1,4	53,4	0,2
		17,2	60,8	2,0	30,7	1,3
		8,6	44,0	2,3	13,9	2,0
		0,0	14,1	4,1	9,9	1,9
G015995 G016017 G016206 G018117	B2M-отриц.	550,0	94,4	0,1	74,2	0,4
		275,0	91,3	0,1	65,2	0,1
		137,5	84,3	0,2	45,4	1,9
		68,8	72,7	0,4	24,5	0,8
		34,4	56,2	1,2	14,1	2,3
		17,2	38,5	0,2	9,9	0,8
		8,6	20,6	0,7	7,6	2,4
		0,0	14,1	4,1	9,9	1,9
G016017 TRAC	CD3-отриц.	550,0	97,3	0,3	94,8	0,4
		275,0	96,0	0,2	87,0	4,9
		137,5	91,9	0,2	72,7	0,9
		68,8	85,7	0,5	65,6	0,1
		34,4	76,6	0,8	51,7	3,0

		17,2	61,8	1,7	35,7	1,1
		8,6	42,1	0,7	20,1	1,5
		0,0	1,0	0,1	0,9	0,1
G016206 TRBC1/2	CD3-отриц.	550,0	97,9	0,1	86,6	0,3
		275,0	96,0	0,1	77,3	0,1
		137,5	90,4	0,8	59,4	0,4
		68,8	82,9	0,1	40,6	1,2
		34,4	71,9	1,5	27,0	1,6
		17,2	53,4	0,3	16,1	0,1
		8,6	32,6	0,6	7,9	0,4
		0,0	0,8	0,0	0,9	0,4
G015995 G016017 G016206 G018117	CD3-отриц.	550,0	98,3	0,2	84,2	0,1
		275,0	96,3	0,1	74,6	0,5
		137,5	90,4	0,3	57,4	1,0
		68,8	81,3	0,3	39,4	0,1
		34,4	66,3	1,6	25,6	0,8
		17,2	48,2	1,0	15,3	0,5
		8,6	27,3	0,7	8,6	0,5
		0,0	0,9	0,1	0,9	0,2
G018117 CIITA	HLA DR DP DQ-отриц.	550,0	95,7	0,4	72,0	0,1
		275,0	92,5	1,1	65,6	0,4
		137,5	85,2	0,6	55,5	0,6
		68,8	74,5	1,1	48,9	0,0
		34,4	65,8	3,7	40,7	0,6
		17,2	49,9	0,1	36,2	0,6
		8,6	41,6	0,8	34,2	1,3
		0,0	30,1	1,6	35,2	0,4
G015995 G016017 G016206 G018117	HLA DR DP DQ-отриц.	550,0	88,0	0,2	52,8	1,1
		275,0	81,2	0,2	46,4	0,4
		137,5	70,4	1,3	39,9	1,8
		68,8	60,0	0,4	39,1	3,3
		34,4	48,8	0,6	37,7	2,9
		17,2	43,0	4,2	37,5	0,6
		8,6	37,8	2,1	35,0	0,0

		0,0	33,0	1,9	37,3	2,1
G015995 G016017 G016206 G018117	B2M-отриц. CD3-отриц. HLA DR DP DQ-отриц.	550,0	84,2	0,0	46,8	1,1
		275,0	76,2	0,0	37,8	0,2
		137,5	63,0	1,3	23,4	2,4
		68,8	48,2	0,2	10,8	0,9
		34,4	31,5	1,1	3,6	0,9
		17,2	17,8	1,7	1,1	0,2
		8,6	6,4	0,0	0,4	0,1
		0,0	0,1	0,0	0,1	0,0

Пример 7: Защита HLA-E Т-клеток с нокаутом B2M в мышиной модели уничтожения NK-клетками in vivo.

[00452] Самкам мышей NOG-hIL-15 прививали $1,5\times10^6$ первичных NK-клеток с последующей инъекцией либо Т-клеток дикого типа, либо Т-клеток с нокаутом B2M, содержащих люциферазу +/- HLA-E, для проверки защиты HLA-E от уничтожения инъецированных Т-клеток Nk-клетками in vivo.

7.1. Последовательное обработка лентивирусом с люциферазой и HLA-E.

[00453] Этот пример объясняет продукцию Т-клеток дикого типа или Т-клеток $B2M^{-/-}$, содержащих люциферазу +/- HLA-E. Электропорированные Т-клетки дикого типа и $B2M^{-/-}$ сначала обрабатывали лентивирусом с люциферазой (Imanis Life Sciences; кат. № LV050L). Позднее Т-клетки $B2M^{-/-}$ последовательно обрабатывали лентивирусом с HLA-E (LVP112). Обработку люциферазой осуществляли путем инфицирования 1×10^6 клеток в 150 мкл лентивируса с люциферазой, дополненного 350 мкл среды № 18, и центрифугировали при 1000×G в течение 60 минут при 37°C. Перед вторым раундом обработки лентивирусом с HLA-E на $B2M^{-/-}$ HLA-E, клетки выдерживали в среде № 2 в течение 2 часов, после чего 1×10^6 клеток обрабатывали 60 мкл вируса с HLA-E в 440 мкл среды № 18. Группа Т-клеток люцифераза$^+$ ДТ и группа клеток $B2M^{-/-}$ люцифераза$^+$ не получали никакого вируса, а центрифугировали в среде № 18 только для того, чтобы поддерживать одинаковые условия в разных группах. После обработки клетки повторно суспендировали и объединяли в назначенные группы в 24-луночном планшете G-Rex и доводили до 7 мл средой № 19, как описано в **Таблице 3**. Свежие цитокины добавляли каждые 2 дня в культуру.

7.2. Получение Т-клеток дикого типа и B2M-/-, содержащих люциферазу +/- HLA-E.

[00454] Свежий пакет для лейкафереза периферической крови здорового человека получали от Stemcell Technologies, клетки ресуспендировали в ФСБ и один раз промывали. Затем клеточный осадок повторно суспендировали в буфере для лизиса эритроцитов с хлоридом аммония (Stemcell Technologies; кат. № 07800) в течение 15 минут с последующим промыванием ФСБ. Количество PBMC определяли после лизиса, и

выделение Т-клеток осуществляли с использованием набора для выделения Т-клеток человека EasySep (Stemcell Technologies, кат. № 17951) в соответствии с протоколом производителя. Выделенные CD3+ Т-клетки ресуспендировали в среде Cryostor CS10 (Stemcell Technologies, кат. № 07930) и замораживали в жидком азоте до дальнейшего использования.

7.3. Электропорация онРНК в Т-клетках.

[00455] РНП были составлены для нокаута B2M с использованием направляющей G000193 (100 мкМ), рекомбинантного белка Cas9-NLS (50 мкМ) и реакционного буфера (1X). Одиночная направляющая G000193 была сначала денатурирована при 95°C в течение 2 минут с последующим охлаждением на льду в течение 10 минут. 6 мкл 50 мкМ Cas9 смешивали с 18 мкл 1X реакционного буфера и 6 мкл денатурированной направляющей G000193 в пробирке для ПЦР, чтобы получить конечный объем 30 мкл. РНП готовили путем инкубации при 25°C в течение 10 минут с последующим оставлением на льду до дальнейшего использования. После размораживания CD3+Т-клетки высевали с плотностью $0{,}5\times10^6$ клеток/мл в среду № 19, содержащую IL-2 (100 ЕД/мл) (Peprotech; кат. № 200-02), IL-7 (2,5 нг/мл) (Stemcell; кат. № 78053.1) и IL-15 (2,5 нг/мл) (Stemcell; кат. № 78031.1). Клетки стимулировали с помощью Transact (разведение 1:100, Miltenyi Biotec; кат. № 130-111-160) в течение 48 часов. После стимуляции 10×10^6 клеток центрифугировали и повторно суспендировали в 80 мкл буфера для электропорации P3 (Lonza; кат. № V4XP-3024) с последующим добавлением 25 мкл РНП и электропорацией в кюветах с использованием электропоратора Lonza с импульсным кодом EO-115. Т-клетки дикого типа прошли аналогичный процесс имитации электропорации только в буфере P3.

7.4. Получение очищенных люциферазы+, HLA-E+, MHC класса I- Т-клеток.

[00456] На 7-й день после обработки клетки собирали, промывали буфером FACS и блокировали с помощью раствора для блокировки Human Tru Stain Fc Block (Biolegend) в течение 5 минут с последующим окрашиванием только антителом к MHC-I APC человека (клон № W6/, Biolegend) или совместным окрашиванием с антителом к HLA-E BV421 человека (Клон № 3D12, Biolegend) в течение 30 минут. Клетки сортировали с использованием BD FACS Aria путем селекции только GFP^+, GFP^+/MHC-I$^-$, GFP^+/MHC-I$^-$ /HLA-E^+ для люцифераза$^+$ Т-клеток дикого типа, $B2M^{-/-}$ люцифераза$^+$ Т-клеток и $B2M^{-/-}$ HLA-E^+ люцифераза$^+$ Т-клеток, соответственно. Собранные клетки промывали и ресуспендировали в среде № 19 и переносили в 6-луночный G-Rex. Клетки стимулировали еще одним раундом Transact в разведении 1:100 в течение 48 часов. Transact отмывали от стимулированных Т-клеток после 48 часов стимуляции и ресуспендировали в среде № 19 и культивировали в планшете G-Rex с добавлением свежих цитокинов каждые 2 дня.

7.5. Подготовка Т-клеток к введению.

[00457] Т-клетки вводили через 10 дней после второй стимуляции после промывки в ФСБ и ресуспендирования в растворе HBSS для введения мышам NOG-IL15.

7.6. Защитное действие HLA-E на Т-клетки с нокаутом B2M in vivo.

[00458] NK-клетки промывали HBSS (Gibco, кат. № 14025-092) и ресуспендировали в концентрации 10×10^6 клеток/мл для введения в 150 мкл. Первоначально мышей разделили на две группы: (1) мыши NOG/IL-15 без введения, контрольная группа (n=1); и (2) 1,5 миллиона первичных NK-клеток (n=2). Дополнительные шесть групп получали следующие виды обработки: (3) только Т-клетки дикого типа (n=4); (4) только $B2M^{-/-}$ Т-клетки (n=4); (5) только $B2M^{-/-}$ HLA-E Т-клетки (n=4), (6) 1,5 миллиона первичных NK-клеток+Т-клеток дикого типа (n=5); (7) 1,5 миллиона первичных NK-клеток+$B2M^{-/-}$ Т-клеток (n=5); и (8) 1,5 миллиона первичных NK-клеток+$B2M^{-/-}$ HLA-E Т-клеток (n=5). Раствор NK-клеток вводили через хвостовую вену с помощью иглы 27 размера.

[00459] Мышам инокулировали клетки дикого типа, $B2M^{-/-}$ или $B2M^{-/-}$ + HLA-E Т-клетки через 28 дней после введения NK-клеток. Клетки готовили в концентрации 6×10^6 клеток/150 мкл объема.

[00460] Визуализацию IVIS проводили для идентификации люцифераза-положительных Т-клеток по спектру IVIS. Визуализацию IVIS проводили через 6 часов, 24 часа, 48 часов, 4 дня, 6 дней, 8 дней, 11 дней, 18 дней, 25 дней, 29 дней, 33 дня, 50 дней, 55 дней, 61 день, 74 дня и через 90 дней после введения Т-клеток. Мышей готовили к визуализации с помощью инъекции D-люциферина в/б 10 мкл/г массы тела в соответствии с рекомендацией производителя, около 150 мкл на животное. Животных анестезировали, а затем помещали в блок визуализации IVIS. Визуализацию выполняли с автоматически установленным временем экспозиции, полем зрения D, средним биннингом и значением F/stop равным 1.

[00461] **На Фиг. 9А** показана защита HLA-E Т-клеток B2M KO от лизиса NK-клетками через 90 дней после введения Т-клеток. **На Фиг. 9В** показана защита HLA-E Т-клеток B2M KO от NK-клеток в течение 90 дней после введения Т-клеток. **На Фиг. 9С** показан защитный эффект HLA-E в течение 30-дневного периода повторного исследования.

Пример 8: Редактирование CIITA в линиях лимфобластоидных клеток.

[00462] Липидные наночастицы (ЛНЧ), содержащие CIITA-направленную РНК, используют для редактирования двух линий лимфобластоидных клеток (LCL). LCL развиваются путем заражения лимфоцитов периферической крови (PBL) доноров-людей вирусом Эпштейна-Барр (EBV). Было продемонстрировано, что этот процесс иммортализирует покоящиеся В-клетки человека in vitro, приводя к возникновению активно пролиферирующей популяции В-клеток, положительной по маркеру В-клеток CD19 и отрицательной по маркеру Т-клеток CD3, а также по маркеру NK-клеток CD56 (Neitzel H. A routine method for the establishment of permanent growing lymphoblastoid cell lines. Hum Genet. 1986;73(4):320-6).

[00463] Лимфобластоидные клеточные линии GM26200 и GM20340 получены из Института медицинских исследований Кориелла (Камден, Нью-Джерси, США). LCL выращивают в среде RPMI-1640 с L-глутамином и 15% ФБС. Во время контактирования с

ЛНЧ клетки активируют 4 нг/мл IL-4 (R&D System кат. № 204-IL-010), 1 нг/мл IL-40 (R&D System кат. № 6245-CL-050), 25 нг/мл BAFF (R&D System Cat кат. № 2149-BF-010). ЛНЧ, нацеленные на B2M, готовят в соотношении 50/10/38,5/1,5 ионизируемого липида B, холестерина, DSPC и PEG2k-DMG, как описано в **Примере 1.3.** ЛНЧ, нацеленные на ATTR, были приготовлены с липидом A, холестерином, DSPC и PEG2k-DMG в молярном соотношении 50:38,5:9:3, соответственно. Составные композиции липида и нуклеиновой кислоты были составлены с молярным соотношением амина липида к фосфату РНК (N:P) около 6 и соотношением нРНК к мРНК 1:2 по массе. ЛНЧ, приготовленные с мРНК Cas9 и CIITA-нРНК, предварительно инкубированные при 37°C в течение примерно 5 минут с сывороткой M. fascicularis (яванского макака) (BioReclamationIVT, кат. № CYN197452) в концентрации 6% (об./об.), доставляют в лимфобластоидные клетки. Через шесть дней после обработки ЛНЧ половину клеток собирают для секвенирования NGS, а через день - другую половину клеток для анализа проточной цитометрией. NGS-анализ выполняют в соответствии со следующим, используя геномную ДНК, которая была выделена с использованием раствора для экстракции ДНК QuickExtract™ (Lucigen, кат. № QE09050) в соответствии с протоколом производителя.

[00464] NGS-анализ выполняли, как в **Примере 1.1**.

[00465] Выполняют проточную цитометрию. Для анализа методом проточной цитометрии клетки промывают буфером FACS (ФСБ+ 2% ФБС+ 2 мМ ЭДТА). Затем клетки блокируют с помощью Human TruStain FcX (Biolegend®, кат. № 422302) при комнатной температуре (КТ) в течение 5 минут и инкубируют с APC- или PE-конъюгированным антителом в разведении 1:200 в течение 30 минут при 4°C. После инкубации клетки промывают и ресуспендируют в буфере, содержащем маркер жизнеспособности 7AAD (разведение 1:1000; Biolegend® кат. № 420404). Клетки обрабатывают с помощью проточной цитометрии, например, с использованием Beckman Coulter CytoflexS™, и анализируют с использованием пакета программного обеспечения FlowJo™.

Пример 9. Анализ направленной геномной гибридизации хромосомной транслокации после редактирования генов CIITA, B2M и TRAC

[00466] Т-клетки, обработанные электропорацией или липидными наночастицами (ЛНЧ) для доставки мРНК Cas9 и онРНК, были проанализированы на наличие хромосомных структурных вариаций, включая транслокации, с помощью направленной геномной гибридизации (dGH™) с помощью KromaTiD (Longmont, CO).

9.1. Обработка электропорацией.

[00467] Для обработки электропорацией Т-клетки выделяли и криоконсервировали следующим образом: Т-клетки либо получали коммерчески (*например*, $CD4^+CD45RA^+$ Т-клетки периферической крови человека, замороженные, Stem Cell Technology, кат. № 70029), либо готовили из лейкопака. Для внутреннего приготовления Т-клетки выделяли путем отрицательной селекции с использованием набора для выделения Т-клеток человека EasySep (Stem Cell Technology, кат. № 17951) в соответствии с протоколом

производителя. Т-клетки были криоконсервированы в среде для замораживания Cryostor® CS10 (кат. № 07930) для будущего использования. Криоконсервированные Т-клетки размораживали и оставляли на ночь в среде № 1, как описано в **Таблице 3**.

[00468] Отдохнувшие Т-клетки подвергали электропорации для доставки комплексов рибонуклеопротеинов (РНП), содержащих направляющие G013674 (SEQ ID NO: 702) или G000529 (SEQ ID NO: 701), нацеленные на гены CIITA и B2M, соответственно. Вкратце, исходные РНП готовили путем инкубации рекомбинантного белка Cas9-NLS (50 мкМ исходного раствора) с онРНК (100 мкМ) до конечной концентрации 20 мкМ Cas9 с 40 мкМ онРНК (соотношение белка Cas9 и направляющей 1:2). Культивируемые Т-клетки собирали в количестве 1×10^6 клеток, ресуспендировали в 100 мкл буфера P3 (Lonza, кат. № V4SP-3960) и инкубировали с 12,5 мкл РНП до конечной концентрации 2 мкМ каждого. Затем Т-клетки подвергали электропорации с использованием Lonza 4D-Nucleofector™5. Электропорированные клетки собирали и выдерживали в течение 48 часов в среде № 1, как описано в **Таблице 3**. Затем собирали Т-клетки, ресуспендировали до плотности 1×10^6 клеток/мл в среде № 1, как описано в **Таблице 3**, и активировали реагентом T-cell TransAct™ (Miltenyi Biotec, кат. № 130-111-160) при разведение 1/100. Через сорок восемь часов после активации Т-клеток Т-клетки подвергали электропорации, как описано выше, с Cas9-РНП, включая G012086 (SEQ ID NO: 703), нацеленную на TRAC. Тройные отредактированные Т-клетки были перенесены обратно в среду № 1, как описано в **Таблице 3**, и размножены для будущего анализа.

[00469] После размножения клетки подвергали процессу истощения с помощью магнитно-активированной сортировки клеток (MACS) для отбора клеток с тройным нокаутом с использованием протокола с микрогранулами антибиотина (Miltenyi Biotec, кат. № 130-090-485) для МНС класса I (Miltenyi Biotec, кат. № 130-120-431), МНС класса II (Miltenyi Biotec, 130-104-823) и CD3-биотина (Miltenyi Biotec, кат. № 130-098-612) в соответствии с протоколом производителя. Отрицательно отобранные клетки собирали для анализа проточной цитометрией и NGS-анализа. Для этих анализов использовали протоколы, описанные в **Примерах 3.3** и **1.1**.

9.2.Последовательная и одновременная обработка ЛНЧ.

[00470] Для обработки ЛНЧ Т-клетки выделяли и криоконсервировали, как в **Примере 3.1**. После размораживания Т-клетки активировали с помощью T-cell TransAct™ (Miltenyi Biotec, кат. № 130-111-160) в соответствии с рекомендациями протокола производителя и культивировали при 37°C в течение 24-72 часов, как указано ниже.

[00471] Для одновременной обработки ЛНЧ Т-клетки обрабатывали через 72 часа после активации тремя ЛНЧ, доставляющими мРНК, кодирующую Cas9 (SEQ ID NO: 809), и онРНК G000529 (SEQ ID NO: 701), G012086 (SEQ ID NO: 703) и G013674 (SEQ ID NO: 702), нацеленными на B2M, TRAC и CIITA, соответственно. ЛНЧ были предварительно инкубированы с сывороткой яванского макака при 37°C в течение 5 минут и дозированы из расчета 100 нг общей РНК-груза на 100 000 Т-клеток. После 24-часового воздействия ЛНЧ клетки промывали и ресуспендировали в среде № 11, как

описано в **Таблице 3**, и культивировали при 37°C в течение 5 дней.

[00472] Для последовательной обработки ЛНЧ Т-клетки обрабатывали через 24 часа после активации одной ЛНЧ, доставляющей мРНК, кодирующую Cas9 (SEQ ID NO: 809) и G000529 (SEQ ID NO: 701), нацеленную на B2M, как описано для одновременной обработки ЛНЧ выше. После промывания и ресуспендирования через 48 часов после активации добавляли одну ЛНЧ, доставляющую мРНК, кодирующую Cas9 (SEQ ID NO: 809) и G013674 (SEQ ID NO: 702), нацеленную на CIITA. Наконец, после промывания и ресуспендирования добавляли одну ЛНЧ, доставляющую мРНК, кодирующую Cas9 (SEQ ID NO: 809) и G012086 (SEQ ID NO: 703), нацеленную на TRAC, через 72 часа после активации. После 24-часового воздействия финальной ЛНЧ клетки промывали и ресуспендировали в среде № 11, как описано в **Таблице 3**, и культивировали при 37°C в течение 5 дней.

[00473] Т-клетки, обработанные ЛНЧ, подвергали процессу тройной отрицательной селекции с помощью MACS, и для этих образцов проводили дальнейший анализ проточной цитометрией (как описано в **Примере 3.2**) и NGS-анализ (как описано в **Примере 1.1**), как описано для электропорированных клеток.

[00474] Обработанные и необработанные клетки анализировали в отношении процента редактирования с помощью NGS (как описано в **Примере 1.1**) и экспрессии белка с помощью проточной цитометрии (как описано в **Примере 3.3**) как до, так и после обработки MACS. Следующие реагенты для проточной цитометрии использовали в качестве фенотипических показателей редактирования генов для B2M, CIITA и TRAC, соответственно: антитело FITC к β2-микроглобулину человека (Biolegend®, кат. № 316304), антитело APC к CD3 человека (Biolegend®, кат. № 300412), антитело PE к HLA-DR, DP, DQ человека (Biolegend®, кат. № 361716). Результаты NGS-редактирования показаны в **Таблице 15** и на **Фиг. 10A** (до MACs), на **Фиг. 10B** (после MACs). Результаты проточной цитометрии показаны в **Таблице 16** и на **Фиг. 11A** (до MACs), на **Фиг. 11B** (после MACs).

[00475] **Таблица 15. Анализ редактирования с помощью NGS.**

Условие	**% редактирований B2M**		**% редактирований CIITA**		**% редактирований TRAC**	
MACS	**До**	**После**	**До**	**После**	**До**	**После**
Без обработки	0,1	0,1	0,2	0,2	0,2	0,1
Одновременно ЛНЧ	97,3	99,3	96,5	98,2	97,3	98,6
Последовательно ЛНЧ	97,0	99,4	99,6	99,8	98,2	98,5
РНП ЕР	98,0	99,1	98,7	99,4	96,7	99,4

[00476] **Таблица 16. Анализ проточной цитометрии.**

Условие	**% отрицательных по B2M**	**% отрицательных по MHC класса II**	**% отрицательных по CD3**

MACS	До	После	До	После	До	После
Без обработки	0,2	0,2	29,4	32,8	0,3	0,2
Одновременно ЛНЧ	87,9	98,4	56,5	95,0	91,7	98,3
Последовательно ЛНЧ	93,2	97,6	67,0	91,8	89,0	97,6
РНП ЕР	85,4	99,9	59,6	89,4	93,1	100

9.3.Анализ Kromatid dGH™ на хромосомные структурные перестановки.

[00477] Сконструированные Т-клетки были подготовлены для процедуры dGH в соответствии с протоколом KromaTiD. Вкратце, Т-клетки культивировали в течение 17 часов с добавлением 5 мкМ BrdU и 1 мкМ BrdC, предоставленных KromaTiD.Добавляли колцемид в концентрации 10 мкл/мл еще на 4 часа. Клетки собирали центрифугированием, инкубировали в 75 мМ гипотоническом растворе KCl в течение 30 минут при комнатной температуре и фиксировали в растворе метанола и уксусной кислоты 3:1.

[00478] Были разработаны три набора зондов для флуоресцентной гибридизации in situ (FISH), чтобы крепления к геномным целевым сайтам направляющих, используемых для конструирования этих Т-клеток, которые расположены на разных хромосомах.Компания KromaTiD визуализировала 200 метафазных спредов на образец, используя запатентованную dGH FISH, и оценила спреды на наличие хромосомных структурных перестановок.Клетки без хромосомных структурных перестановок показали 3 смежных пары сигналов FISH совпадающих цветов. «Делеции» оценивались, когда в клетке идентифицировали нулевые сигналы FISH для целевого сайта, что указывало на хромосомную перестановку, при которой фрагменты были потеряны во время цикла клеточной репликации из-за происходящего события редактирования. «Реципрокные транслокации» оценивались для каждой пары смежных, несовпадающих по цвету сигналов FISH, что указывало на транслокацию между двумя целевыми расщеплениями Cas9 (например, между целевыми сайтами B2M и TRAC). «Транслокации в нецелевые хромосомы» показали один сигнал FISH, указывающий на слияние между целевым сайтом расщепления Cas9 и немеченым хромосомным сайтом.

[00479] «Комплексные транслокации» обозначают сигналы FISH, не включенные в реципрокные транслокации и транслокации в нецелевые сайты..Общее количество транслокаций рассчитывали как сумму реципрокных транслокаций, транслокаций в нецелевые хромосомы/сайты в геноме и комплексных транслокаций.В **Таблице 17** и на **Фиг. 12** показаны хромосомные перестановки, определенные этим методом для каждого состояния.

[00480] **Таблица 17. Анализ транслокаций с помощью анализа Kromatid dGH.**

События хромосомных перестановок:	**Без обработки**	**Последовательно ЛНЧ**	**Одновременно ЛНЧ**	**РНП ЕР**

Всего транслокаций	1	0	7	13
Взаимные транслокации	0	0	2	3
Транслокации в нецелевые хромосомы	1	0	3	9
Комплексные транслокации	0	0	2	1
Делеции	0	8	6	30

Пример 10: Нецелевой анализ

10.1. Биохимический нецелевой анализ.

[00481] Биохимический метод (см., например, Cameron et al., Nature Methods. 6, 600-606; 2017) использовали для определения потенциальных нецелевых геномных сайтов, расщепляемых Cas9, с использованием специальных направляющих, нацеленных на CIITA. В этом эксперименте две онРНК, нацеленные на CIITA человека, подвергали скринингу с использованием геномной ДНК, очищенной из клеточной линии лимфобластов NA24385 (Институт Кориелла), наряду с тремя контрольными направляющими с известными нецелевыми профилями. Количество потенциальных нецелевых сайтов, обнаруженных с использованием направляющей в концентрации 192 нМ и белка Cas9 64 нМ в биохимическом анализе, показано в **Таблице 18**.

[00482] **Таблица 18: Биохимический нецелевой анализ.**

SEQ ID NO:		**Цель**	**Количество сайтов**
71	G018091	CIITA	603
80	G018100	CIITA	291
100	G018120	CIITA	203
707	G000644	EMX1	440
708	G000645	VEGFA	6384
709	G000646	RAG1B	144
SEQ ID NO:		**Цель**	**Количество сайтов**
14	G018034	CIITA	14
15	G018035	CIITA	3
58	G018078	CIITA	49
61	G018081	CIITA	9
62	G018082	CIITA	23
66	G018086	CIITA	353
81	G018101	CIITA	13

84	G018104	CIITA	38
85	G018105	CIITA	93
87	G018107	CIITA	36
88	G018108	CIITA	56
89	G018109	CIITA	73
707	G000644	EMX1	276
708	G000645	VEGFA	3259
709	G000646	RAG1B	32

10.2. Целевое секвенирование для валидации потенциальных нецелевых сайтов.

[00483] Потенциальные нецелевые сайты, предсказанные с помощью анализов обнаружения, таких как использованный выше биохимический метод, можно оценить с помощью целевого секвенирования идентифицированных потенциальных нецелевых сайтов, чтобы определить, обнаружено ли нецелевое расщепление в этом сайте.

[00484] В одном подходе Cas9 и интересующую онРНК (например, онРНК, имеющая потенциальные нецелевые сайты для оценки) вводят в первичные Т-клетки. Затем Т-клетки лизируют и используют праймеры, фланкирующие потенциальные нецелевые сайты, для создания ампликона для NGS-анализа. Идентификация инделей на определенном уровне может подтвердить потенциальный нецелевой сайт, тогда как отсутствие инделей, обнаруженных на потенциально нецелевом сайте, может указывать на ложноположительный результат нецелевого прогностического анализа, который был использован.

Пример 11: Скрининг CIITA-направленной РНК в Т-клетках с помощью BC22n

[00485] Различные онРНК проверяли на их способность нокаутировать ген CIITA в Т-клетках человека с использованием редактирования оснований C на T. Процент Т-клеток, отрицательных в отношении экспрессии белка MHC класса II и/или CD74, анализировали после редактирования CIITA после электропорации мРНК и различными онРНК.

11.1 Подготовка Т-клеток

[00486] Аферез от здоровых доноров был получен коммерчески (Hemacare), клетки промыты и ресуспендированы в буфере CliniMACS® ФСБ/ЭДТА (Miltenyi Biotec, кат. № 130-070-525) и обработаны в устройстве Cell 24 Separator Plus MultiMACS™ (Miltenyi Biotec). Т-клетки выделяли посредством положительной селекции с использованием набора CD4/CD8 MicroBead Straightfrom Leukopak® для человека (Miltenyi Biotec, кат. № 130-122-352). Т-клетки разделяли на аликвоты и криоконсервировали для будущего использования в CS10 Cryostor® (StemCell Technologies, кат. № 07930).

[00487] После размораживания Т-клетки высевали с плотностью 1,0×10^6 клеток/мл в среду для роста Т-клеток (TCGM), состоящую из CTS OpTimizer T Cell Expansion SFM и T Cell Expansion Supplement (ThermoFisher кат. № A1048501), 5% сыворотки AB человека (GeminiBio, кат. № 100-512), 1X пенициллин-стрептомицина, 1X

глутамакса, 10 мМ HEPES, 200 ед/мл рекомбинантного интерлейкина-2 человека (Peprotech, кат. № 200-02), 5 нг/мл рекомбинантного интерлейкина- 7 человека (Peprotech, кат. № 200-07) и 5 нг/мл рекомбинантного интерлейкина-15 человека (Peprotech, кат. № 200-15). Т-клетки выдерживали в этой среде в течение 24 часов, после чего их активировали с помощью реагента T Cell TransAct™ для человека (Miltenyi, кат. № 130-111-160), добавленного в соотношении 1:100 по объему. Т-клетки активировали за 48 часов до электропорации.

11.2 Редактирование Т-клеток с помощью электропорации РНК

[00488] Растворы, содержащие мРНК, кодирующую BC22n (SEQ ID NO: 804 или 805) и UGI (SEQ ID NO: 807 или 808), готовили в буфере P3. Сто мкМ нацеленных на CIITA онРНК удаляли из их планшетов для хранения, денатурировали в течение 2 минут при 95 °C и инкубировали при комнатной температуре в течение 5 минут. Через 48 часов после активации Т-клетки собирали, центрифугировали и ресуспендировали в концентрации 12,5×10^6 Т-клеток/мл в буфере для электропорации P3 (Lonza). Для электропорации 1×10^5 Т-клеток смешивали с 20 нг/мкл мРНК BC22n, 20 нг/мкл мРНК UGI и 20 пмоль онРНК, как описано в Таблице 1, в конечном объеме 20 мкл буфера для электропорации P3. Эту смесь переносили в двух повторностях в 96-луночный планшет Nucleofector™ и подвергали электропорации, используя код импульса производителя. Электропорированные Т-клетки немедленно выдерживали в 80 мкл среды для выращивания Т-клеток CTS Optimizer без цитокинов в течение 15 минут, а затем переносили в новые 96-луночные планшеты с плоским дном, содержащие дополнительные 80 мкл среды для выращивания Т-клеток CTS Optimizer с добавлением 2X цитокинов. Полученные планшеты инкубировали при 37°C в течение 10 дней. На 4-й день после электропорации клетки разделяли 1:2 на 2 планшета с U-образным дном. Один планшет собирали для NGS-секвенирования, а другой планшет заполняли свежей средой CTS Optimizer с 1X цитокинов. Этот планшет использовали для проточной цитометрии на 7-й день.

11.3 Проточная цитометрия и NGS-секвенирование

[00489] На 7-й день после редактирования Т-клетки анализировали с помощью проточной цитометрии для определения поверхностной экспрессии CD74 и HLA-DR, DP, DQ. Вкратце, Т-клетки инкубировали в течение 30 минут при 4 °C со смесью антител, разведенных в буфере для окрашивания клеток (BioLegend, кат. № 420201). Антитела к CD3 (BioLegend, кат. № 317336), CD4 (BioLegend, кат. № 317434), CD8 (BioLegend, кат. № 301046) и Viakrome (Beckman Coulter, кат. № C36628) разводили в соотношении 1:100, а антитела к HLA II-DR (BioLegend, кат. № 327018), HLA II-DP (BD Biosciences, кат. № 750872), HLA II-DQ (BioLegend, кат. № 561504) и CD74 (BioLegend, кат. № 326808) разводили в соотношении 1:50. Затем клетки промывали, ресуспендировали в 100 мкл буфера для окрашивания клеток и обрабатывали на проточном цитометре Cytoflex (Beckman Coulter). Данные проточной цитометрии анализировали с помощью программного пакета FlowJo. Т-клетки были отобраны на основе размера, формы,

жизнеспособности, экспрессии CD8, HLA II-DP, HLA II-DQ, HLA II-DR и CD74.

Таблица 19: Процент клеток, отрицательных по поверхностному белку, после геномного редактирования CIITA с помощью BC22n. (n=2)

Идентификатор направляющей послед-ти	%HLA II-DP-		%HLA II-DQ-		%HLA II-DR-		%CD74-	
	Среднее	CO	Среднее	CO	Среднее	CO	Среднее	CO
G000502	68,70	3,54	76,30	4,24	76,70	3,96	66,25	5,87
G018021	76,60	0,99	84,00	0,57	84,65	0,49	76,85	0,07
G018022	60,00	3,39	72,20	1,13	73,25	1,34	60,35	2,62
G018023	64,80	2,97	74,35	0,07	75,85	0,35	63,85	2,33
G018024	64,10	1,70	74,80	1,84	74,90	1,98	63,75	4,03
G018025	63,85	6,15	73,50	6,08	74,90	6,36	63,75	6,72
G018026	72,15	4,17	81,35	0,92	82,55	1,48	73,00	0,71
G018027	82,40	0,99	81,45	1,91	82,40	2,26	72,35	3,32
G018028	78,25	0,49	78,40	0,00	80,05	0,49	67,90	2,40
G018029	75,60	3,11	74,80	0,14	76,95	0,07	64,15	2,05
G018030	76,70	1,56	76,35	3,46	77,80	3,54	66,65	5,44
G018031	81,40	3,96	84,00	1,13	82,40	0,42	75,55	0,49
G018032	77,00	2,97	79,70	0,14	79,30	0,42	70,35	0,92
G018033	81,15	3,04	82,05	0,35	81,60	0,57	73,20	1,27
G018034	96,87	0,43	93,49	0,88	92,67	0,99	92,96	1,63
G018035	94,39	0,64	88,20	1,13	88,64	2,03	83,70	2,97
G018036	73,80	0,28	76,45	2,19	77,55	2,90	65,30	3,82
G018037	71,80	0,14	72,25	5,16	73,85	5,73	61,40	7,64
G018038	70,25	7,85	74,95	1,06	75,65	2,05	63,65	2,62
G018039	94,72	0,49	91,67	0,05	91,17	0,51	89,20	0,99
G018040	77,30	1,13	81,70	0,42	81,60	0,57	72,35	0,64
G018041	75,10	1,70	80,15	0,35	80,15	0,21	70,50	0,85
G018042	89,35	0,49	86,60	0,14	87,90	0,14	80,50	0,00
G018043	85,50	1,13	84,00	1,56	84,95	0,35	77,55	0,64
G018044	88,20	0,99	89,01	1,57	89,25	0,78	83,95	2,19
G018045	76,15	1,34	82,35	2,33	81,60	2,26	72,50	3,25
G018046	87,20	0,42	88,65	0,21	89,00	0,57	82,80	1,27

G018047	79,95	1,63	84,60	2,12	84,25	2,76	76,25	3,61
G018048	88,50	2,12	88,00	1,13	89,50	0,42	81,60	0,14
G018049	81,40	3,25	81,40	4,24	82,60	5,23	74,00	5,66
G018050	77,75	0,49	78,60	0,85	80,85	0,07	70,25	0,35
G018051	81,20	1,56	81,95	1,48	84,20	1,13	73,55	3,04
G018052	76,30	1,56	81,70	1,27	81,10	1,56	70,90	2,69
G018053	77,25	1,06	81,40	0,85	82,35	1,06	71,55	1,63
G018054	90,23	0,14	89,00	0,99	89,25	0,64	84,50	0,28
G018055	73,80	3,39	79,20	0,99	79,85	1,06	67,80	1,41
G018056	73,40	2,97	83,15	0,35	83,15	0,78	73,15	0,78
G018057	73,95	1,63	81,40	2,97	81,45	1,91	71,30	3,11
G018058	73,40	3,25	80,90	0,99	81,05	0,07	69,15	0,35
G018059	75,15	4,17	81,70	0,14	81,55	0,07	71,10	1,13
G018060	75,90	2,69	81,30	0,28	81,55	0,78	72,05	1,91
G018061	71,65	2,05	81,60	1,41	80,65	1,06	72,00	1,41
G018062	70,75	2,33	75,05	0,64	76,30	1,56	64,65	2,33
G018063	78,45	0,92	80,95	0,92	82,20	0,85	72,50	0,14
G018064	76,15	0,78	82,50	0,00	82,90	0,28	73,90	0,28
G018065	77,65	0,21	82,60	0,42	83,85	0,35	74,05	0,07
G018066	72,60	0,00	82,30	0,28	83,05	0,64	73,60	0,14
G018067	97,57	0,81	98,24	0,19	97,73	0,28	98,83	0,04
G018068	89,05	0,64	90,79	0,52	90,81	1,02	87,20	1,27
G018069	75,90	2,55	81,55	0,92	82,15	0,35	71,85	1,20
G018070	75,30	1,27	82,05	1,20	82,15	0,64	71,20	0,42
G018071	77,40	3,39	83,35	1,77	84,75	1,91	74,65	0,92
G018072	72,05	1,63	81,45	0,78	81,95	1,91	71,95	2,62
G018073	72,35	0,07	79,30	1,13	79,25	2,19	69,40	2,26
G018074	67,25	2,05	75,25	0,49	76,40	0,57	64,35	0,35
G018075	96,86	1,46	97,33	0,14	96,08	0,31	98,35	0,04
G018076	94,26	4,87	97,96	0,21	97,57	0,15	98,55	0,06
G018077	74,75	2,76	81,65	0,35	82,25	0,21	72,25	1,34
G018078	94,30	0,48	94,87	0,31	95,03	0,06	93,43	0,24
G018079	86,00	1,56	89,55	0,35	89,80	0,28	84,25	0,78
G018080	80,50	3,96	85,50	1,70	85,45	1,63	78,35	0,78

G018081	79,85	1,06	86,05	1,20	86,00	0,85	78,70	0,57
G018082	80,10	0,14	83,10	0,42	84,05	1,20	75,65	1,91
G018083	86,75	1,34	89,50	0,28	89,35	0,21	84,55	0,21
G018084	84,60	3,25	87,35	1,34	87,95	0,92	82,00	1,27
G018085	86,95	2,76	90,35	2,05	90,03	1,03	86,30	2,26
G018086	68,15	1,34	78,60	0,42	75,95	0,07	66,25	0,92
G018087	61,40	2,26	74,35	2,33	72,65	2,62	61,85	1,63
G018088	88,80	0,85	91,11	0,28	91,88	0,11	87,60	1,41
G018089	81,75	4,17	89,00	1,83	89,28	1,53	83,75	1,77
G018090	81,65	1,20	90,11	0,29	89,98	0,25	85,35	1,34
G018091	97,02	0,49	98,63	0,03	98,15	0,12	98,98	0,08
G018092	71,40	5,23	81,90	0,71	82,40	0,85	73,45	0,92
G018093	94,15	1,20	96,36	0,21	96,36	0,02	95,70	0,18
G018094	77,50	2,12	84,55	1,63	85,25	1,48	76,50	0,14
G018095	69,50	0,00	83,05	0,07	82,70	0,14	73,90	0,99
G018096	69,25	0,21	83,50	0,99	83,45	1,06	75,25	2,05
G018097	68,55	4,74	81,60	2,83	82,20	1,84	73,25	3,75
G018098	66,65	0,21	78,85	0,21	79,75	0,21	68,75	1,20
G018099	65,05	3,18	73,70	4,95	74,55	4,31	62,40	4,53
G018100	95,51	0,40	95,99	0,19	95,62	0,92	96,21	0,18
G018101	93,00	0,33	93,70	0,01	94,03	0,25	93,11	0,28
G018102	96,55	0,33	96,31	0,64	96,34	0,08	96,58	0,08
G018103	96,92	1,46	97,58	0,02	97,53	0,08	98,36	0,40
G018104	72,00	0,99	82,45	2,19	82,70	1,84	73,40	2,12
G018105	71,60	1,98	82,20	0,71	81,80	0,28	73,30	0,00
G018106	92,49	1,33	98,62	0,06	97,03	0,43	98,96	0,04
G018107	96,55	1,25	98,14	0,56	97,53	0,70	98,98	0,08
G018108	85,50	0,42	88,00	0,71	89,35	0,92	83,40	1,56
G018109	84,10	1,56	84,55	2,19	86,90	1,27	79,75	3,32
G018110	67,65	3,04	75,15	0,49	77,50	0,99	65,35	1,48
G018111	96,49	0,35	96,85	1,05	95,24	1,32	97,03	0,52
G018112	68,60	5,09	76,65	4,88	77,30	4,53	66,60	4,38
G018113	72,75	3,89	79,60	3,54	80,15	2,76	70,30	3,96
G018114	70,80	2,26	80,05	2,47	81,25	1,77	71,65	2,62

G018115	62,40	1,41	77,40	0,57	76,90	1,27	67,00	1,56
G018116	96,05	0,89	98,01	0,39	96,99	0,42	98,32	0,21
G018117	96,93	1,27	97,63	0,52	97,19	0,87	98,96	0,25
G018118	97,25	0,51	97,71	0,25	96,94	0,44	98,91	0,26
G018119	94,78	1,02	96,29	1,11	95,57	1,05	97,00	1,20
G018120	96,04	1,87	97,61	0,06	97,42	0,56	98,94	0,07
G018121	95,26	0,62	97,12	0,41	96,44	0,23	97,85	0,45

[00490] На 4-й день после редактирования образцы ДНК подвергали ПЦР и последующему NGS-анализу, как описано в Примере 1. В Таблице 20 показаны результаты редактирования CIITA в Т-клетках, отредактированных с помощью Bc22n.

Таблица 20: Средний процент редактирования локуса CIITA с помощью BC22n. (n=2)

Идентификатор направляющей послед-ти	**% C-наT**		**% C-наA/G**		**% инделов**	
	Среднее	**CO**	**Среднее**	**CO**	**Среднее**	**CO**
G000502	84,63	2,39	0,82	0,19	1,26	0,37
G018021	91,14	2,38	2,45	0,52	3,22	2,60
G018022	93,68	3,27	1,83	0,33	1,46	0,10
G018023	92,37	1,73	2,25	0,07	2,31	0,52
G018024	96,06	1,54	0,41	0,37	0,97	0,07
G018025	96,88	0,78	0,63	0,12	0,43	0,06
G018026	89,15	1,37	1,66	0,04	7,20	1,31
G018027	88,89	3,13	1,02	0,04	5,37	2,62
G018028	91,28	2,09	0,59	0,24	2,96	2,02
G018029	22,86	0,72	0,43	0,07	0,17	0,02
G018030	79,89	2,66	0,36	0,51	0,18	0,25
G018031	90,43	1,35	0,47	0,38	1,52	0,07
G018032	64,78	2,64	1,39	0,69	1,06	0,50
G018033	88,94	0,84	1,98	0,29	1,97	0,44
G018034	89,00	1,56	1,09	0,11	6,23	0,88
G018035	95,10	1,59	0,50	0,25	0,66	0,17
G018036	83,69	0,01	1,91	0,30	0,53	0,20
G018037	94,50	0,54	1,64	0,03	1,18	0,23
G018038	90,91	0,00	1,11	0,00	3,74	0,00
G018039	94,88	0,00	0,60	0,00	0,41	0,00

G018040	44,77	1,52	0,33	0,14	0,50	0,03
G018041	66,56	2,05	0,60	0,30	0,27	0,20
G018042	90,79	1,10	1,28	0,47	1,64	0,35
G018043	94,94	0,55	0,57	0,03	0,40	0,06
G018044	91,71	1,61	0,89	0,40	1,25	0,20
G018045	90,26	1,59	1,46	0,54	3,91	1,89
G018046	94,59	1,33	0,76	0,05	2,03	0,64
G018047	93,84	1,32	0,46	0,08	2,03	0,64
G018048	95,20	2,58	0,54	0,52	0,62	0,30
G018049	89,68	2,09	0,17	0,23	0,45	0,30
G018050	95,74	0,65	0,31	0,22	0,84	0,39
G018051	92,47	0,90	0,54	0,76	0,73	0,31
G018052	93,14	0,85	1,39	0,91	0,85	0,78
G018053	78,88	3,77	0,74	0,13	0,52	0,34
G018054	92,69	1,11	0,79	0,10	2,55	0,46
G018055	89,68	1,52	0,48	0,57	1,05	0,36
G018056	94,00	1,10	0,45	0,14	1,85	0,99
G018057	89,87	0,49	0,72	0,04	1,31	0,31
G018058	91,04	0,77	0,59	0,12	1,46	0,28
G018059	49,64	3,56	0,46	0,19	1,56	0,43
G018060	97,65	0,65	1,22	0,17	1,13	0,47
G018061	92,52	0,29	0,89	0,33	2,76	0,52
G018062	88,19	0,72	0,84	0,18	6,65	0,41
G018063	92,94	0,63	1,54	0,20	0,94	0,38
G018064	94,14	1,12	1,38	0,31	0,97	0,09
G018065	93,20	1,50	1,32	0,57	0,91	0,23
G018066	91,62	0,45	1,69	0,06	0,45	0,17
G018067	92,72	1,43	3,06	0,48	0,42	0,15
G018068	93,33	0,49	0,62	0,08	0,27	0,06
G018069	93,83	0,77	0,94	0,33	0,99	0,07
G018070	94,61	0,57	0,59	0,08	1,33	0,35
G018071	87,61	0,46	0,26	0,22	1,10	0,29
G018072	92,86	0,84	1,76	0,04	0,34	0,06
G018073	87,03	0,52	1,48	0,33	0,40	0,15

G018074	80,06	11,41	0,42	0,13	0,46	0,24
G018075	92,85	0,27	0,59	0,37	0,61	0,08
G018076	95,88	1,59	0,56	0,38	0,61	0,30
G018077	0,23	0,12	0,55	0,26	0,13	0,08
G018078	94,97	1,42	0,48	0,16	0,44	0,22
G018079	89,45	1,79	0,38	0,26	0,81	0,47
G018080	80,86	3,14	0,22	0,15	0,58	0,35
G018081	93,61	0,63	0,17	0,14	0,91	0,44
G018082	93,15	1,21	0,16	0,07	1,80	0,50
G018083	78,69	0,88	0,29	0,13	2,73	0,50
G018084	81,88	0,70	0,43	0,19	1,39	0,60
G018085	93,17	1,26	0,44	0,16	2,62	0,43
G018086	95,03	1,07	0,61	0,20	1,39	0,44
G018087	94,37	1,49	1,07	0,79	1,41	0,21
G018088	91,62	1,31	1,01	0,43	1,91	0,99
G018089	94,41	1,17	0,75	0,41	3,04	1,52
G018090	93,66	0,82	0,54	0,28	3,12	0,96
G018091	96,82	0,00	0,60	0,00	0,77	0,00
G018092	90,55	1,58	0,74	0,27	2,02	0,34
G018093	94,46	0,49	1,13	0,13	0,96	0,28
G018094	82,55	5,17	0,55	0,11	12,35	6,02
G018095	94,60	0,85	1,94	0,68	0,75	0,21
G018096	54,68	0,62	1,99	0,16	0,38	0,12
G018097	91,89	2,73	0,96	0,89	1,01	0,80
G018098	70,42	0,00	0,35	0,00	0,00	0,00
G018099	96,84	0,16	0,43	0,10	0,64	0,16
G018100	93,24	1,08	0,77	0,20	3,07	0,06
G018101	92,34	0,51	2,16	0,73	3,06	0,06
G018102	91,87	0,99	0,42	0,34	0,61	0,16
G018103	94,50	1,22	0,59	0,22	1,25	0,53
G018104	94,14	0,76	0,31	0,14	1,09	0,65
G018105	95,51	0,98	0,42	0,14	0,82	0,21
G018106	94,77	0,90	1,12	0,18	2,15	0,28
G018107	94,66	0,57	0,80	0,03	2,09	0,04

G018108	94,77	1,14	1,23	0,70	1,55	0,96
G018109	94,40	1,37	1,06	0,91	1,80	0,67
G018110	92,19	1,30	1,86	0,34	4,04	0,77
G018111	91,96	3,12	0,72	0,17	5,54	3,11
G018112	91,54	1,34	0,80	0,15	5,69	0,44
G018113	96,42	0,45	0,43	0,22	1,40	0,35
G018114	95,95	0,89	0,79	0,32	0,27	0,20
G018115	92,89	1,00	0,59	0,16	1,10	0,40
G018116	91,94	0,57	0,99	0,54	0,61	0,24
G018117	95,48	1,10	0,62	0,31	0,55	0,31
G018118	96,20	0,38	0,43	0,31	0,46	0,17
G018119	83,25	1,31	0,43	0,08	0,44	0,25
G018120	97,00	0,72	0,42	0,26	0,38	0,20
G018121	95,42	0,58	0,50	0,13	0,42	0,15

Пример 12:Ддозозависимый скрининг CIITA-онРНК с помощью BC22n в Т-клетках

[00491] Выбранные CIITA-онРНК, идентифицированные в Примере 11, дополнительно анализировали на эффективность редактирования оснований при нескольких концентрациях направляющих в Т-клетках. Эффективность каждого из них оценивали по эффективности редактирования генома с помощью NGS или по нарушению экспрессии поверхностных белков HLA-DR, DP, DQ с помощью проточной цитометрии.

12.1 Подготовка Т-клеток

[00492] Аферез от здоровых доноров был получен коммерчески (Hemacare), клетки были промыты и ресуспендированы в буфере ФСБ/ЭДТА CliniMACS® (Miltenyi Biotec, кат. № 130-070-525) и обработаны в устройстве MultiMACS™ Cell 24 Separator Plus (Miltenyi Biotec). Т-клетки выделяли посредством положительной селекции с использованием набора CD4/CD8 MicroBead Straightfrom Leukopak® для человека (Miltenyi Biotec, кат. № 130-122-352). Т-клетки разделяли на аликвоты и криоконсервировали для будущего использования в CS10 Cryostor® (StemCell Technologies, кат. № 07930).

[00493] После размораживания Т-клетки высевали с плотностью 1,0×10^6 клеток/мл в среду для роста Т-клеток (TCGM), состоящую из CTS OpTmizer T Cell Expansion SFM и T Cell Expansion Supplement (ThermoFisher кат. № A1048501), 5% сыворотки АВ человека (GeminiBio, кат. № 100-512), 1X пенициллин-стрептомицина, 1X глутамакса, 10 мМ HEPES, 200 ЕД/мл рекомбинантного интерлейкина-2 человека (Peprotech, кат. № 200-02), 5 нг/мл рекомбинантного интерлейкина 7 человека (Peprotech, кат. № 200-07) и 5 нг/мл рекомбинантного интерлейкина 15 человека (Peprotech, кат. №

200-15). Т-клетки выдерживали в этой среде в течение 24 часов, после чего их активировали с помощью реагента T Cell TransAct™ для человека (Miltenyi, кат. № 130-111-160), добавленного в соотношении 1:100 по объему. Т-клетки активировали за 48 часов до электропорации.

12.2 Редактирование Т-клеток с помощью электропорации РНК

[00494] Растворы, содержащие мРНК, кодирующие BC22n (SEQ ID NO: 804 или 805) и UGI (SEQ ID NO: 807 или 808), готовили в буфере P3. 100 мкМ нацеленных на CIITA онРНК удаляли из их планшетов для хранения, денатурировали в течение 2 минут при 95°C и инкубировали при комнатной температуре в течение 5 минут. Через 48 часов после активации Т-клетки собирали, центрифугировали и ресуспендировали в концентрации 12,5×10^6 Т-клеток/мл в буфере для электропорации P3 (Lonza). Каждую онРНК серийно разбавляли в соотношении 1:2 в буфере для электропорации P3, начиная с 60 пмоль, в 96-луночном планшете для ПЦР в двух повторностях. После разбавления 1×10^5 Т-клеток, 20 нг/мкл мРНК BC22n и 20 нг/мкл мРНК UGI смешивали в планшете с онРНК, чтобы получить конечный объем 20 мкл буфера для электропорации P3. Эту смесь переносили в 4 соответствующих 96-луночных планшета Nucleofector™ и подвергали электропорации с использованием импульсного кода производителя. Электропорированные Т-клетки немедленно выдерживали в 80 мкл среды для выращивания Т-клеток CTS Optimizer без цитокинов в течение 15 минут, а затем переносили в новые 96-луночные планшеты с плоским дном, содержащие дополнительные 80 мкл среды для выращивания Т-клеток CTS OpTmizer с добавлением 2X цитокинов. Полученные планшеты инкубировали при 37°C в течение 7 дней.На 4-й день после электропорации клетки разделяли 1:2 на два планшета с U-образным дном и один планшет собирали для NGS-секвенирования, а другой планшет заполняли свежей средой CTS Optimizer с 1X цитокинов. Этот планшет использовали для проточной цитометрии на 7-й день.

12.3 Проточная цитометрия и NGS-секвенирование

[00495] На 7-й день после редактирования Т-клетки анализировали с помощью проточной цитометрии для определения поверхностной экспрессии HLA-DR, DP, DQ. Вкратце, Т-клетки инкубировали в течение 30 минут при 4 °C со смесью антител, разведенных в буфере для окрашивания клеток (BioLegend, кат. № 420201). Антитела к CD3 (BioLegend, кат. № 317336), CD4 (BioLegend, кат. № 317434), CD8 (BioLegend, кат. № 301046) и Viakrome (Beckman Coulter, кат. № C36628) разводили в соотношении 1:100, а антитела к HLA II-DR, DP, DQ (BioLegend, кат. № 361714) разводили в соотношении 1:50. Затем клетки промывали, ресуспендировали в 100 мкл буфера для окрашивания клеток и обрабатывали на проточном цитометре Cytoflex (Beckman Coulter). Данные проточной цитометрии анализировали с помощью программного пакета FlowJo. Т-клетки были отобраны по размеру, форме, жизнеспособности, CD8 и HLA-DR, DP, DQ.

[00496] **В Таблице 21** показаны результаты редактирования CIITA и процент Т-клеток отрицательных по HLA-DR, DP, DQ в Т-клетках после редактирования оснований

с помощью Bc22n.

Таблица 21: Процент редактирования и процент отрицательных по HLA II-DP, DQ, DR клеток после редактирования CIITA с помощью редактора оснований BC22n

		C>T			% HLA II-DR, DP, DQ			% CD74		
	онРНК (пмоль)	**Сред.**	**СО**	**N**	**Сред.**	**СО**	**N**	**Сред.**	**СО**	**N**
G018067	60	95,58%	0,35%	2	99,40	0,00	2	91,45	1,34	2
	30	94,13%	0,08%	2	98,90	0,42	2	91,75	1,63	2
	15	91,49%	0,05%	2	95,95	0,21	2	89,45	0,07	2
	7,5	77,17%	1,50%	2	83,95	0,92	2	76,6	0,57	2
	3,75	56,15%	1,07%	2	71,00	0,71	2	63,65	4,03	2
	1,88	32,76%	0,32%	2	57,65	3,46	2	50,6	3,39	2
	0,94	17,47%	0,95%	2	50,85	3,04	2	46,1	3,82	2
	0	0,41%	0,01%	2	49,45	5,16	2	47,85	1,91	2
G018075	60	96,12%	1,35%	2	98,25	0,07	2	92	1,27	2
	30	94,07%	3,53%	2	97,45	1,06	2	88,65	2,76	2
	15	92,08%	0,90%	2	97,10	0,14	2	87,25	2,05	2
	7,5	83,76%	3,28%	2	90,65	0,21	2	80,1	2,69	2
	3,75	67,35%	2,13%	2	78,85	0,21	2	67,1	2,97	2
	1,88	42,66%	2,51%	2	63,65	0,07	2	52,55	2,33	2
	0,94	25,54%	0,32%	2	56,55	3,75	2	43,1	3,25	2
	0	0,23%	0,02%	2	48,70	1,84	2	42,1	0,42	2
G018091	60	97,80%	нет данных	2	99,65	0,21	2	92,2	0,57	2
	30	96,32%	0,91%	2	97,50	0,28	2	88,7	1,7	2
	15	84,48%	2,73%	2	91,90	0,71	2	82,1	0,71	2
	7,5	76,56%	0,49%	2	78,05	1,63	2	64,15	0,35	2
	3,75	52,08%	1,50%	2	67,00	1,56	2	46,8	1,84	2
	1,88	30,00%	2,36%	2	58,80	2,55	2	40,7	2,4	2
	0,94	15,01%	1,12%	2	50,70	2,26	2	33	2,83	2
	0	0,00%	0,00%	2	47,90	1,70	2	39	0	2

G018100	60	95,55%	0,47%	2	94,30	0,57	2	85,3	2,69	2
	30	95,22%	1,02%	2	91,75	0,78	2	79,1	0,85	2
	15	93,33%	0,49%	2	90,80	0,99	2	77,1	0,28	2
	7,5	88,77%	0,15%	2	84,40	0,85	2	69,9	1,56	2
	3,75	71,03%	4,26%	2	75,20	2,40	2	54,4	0,57	2
	1,88	46,87%	1,95%	2	63,80	0,28	2	45,7	0,28	2
	0,94	27,20%	0,21%	2	54,80	1,56	2	36,5	2,4	2
	0	0,17%	0,04%	2	52,25	1,63	2	42,8	0	2
G018102	60	93,32%	0,10%	2	93,00	0,14	2	84,65	0,64	2
	30	77,08%	2,22%	2	80,40	1,84	2	68,7	2,55	2
	15	52,42%	1,28%	2	70,50	0,28	2	55,4	0,85	2
	7,5	31,87%	0,20%	2	58,80	4,53	2	39,4	4,38	2
	3,75	16,76%	0,26%	2	56,85	1,63	2	33,65	0,07	2
	1,88	8,18%	0,06%	2	54,15	0,21	2	30,35	0,92	2
	0,94	4,12%	0,66%	2	52,25	3,32	2	32,2	0,57	2
	0	0,28%	0,12%	2	50,00	3,68	2	42,45	4,17	2
G018103	60	96,34%	0,21%	2	98,85	0,07	2	89,2	2,12	2
	30	90,93%	0,17%	2	95,15	0,92	2	84,95	0,07	2
	15	80,01%	0,34%	2	87,95	1,63	2	76,7	0,14	2
	7,5	59,92%	0,48%	2	70,90	2,97	2	56,45	3,18	2
	3,75	36,07%	1,23%	2	62,05	2,33	2	44,65	0,49	2
	1,88	19,59%	2,15%	2	58,65	2,76	2	38,2	1,41	2
	0,94	7,98%	0,08%	2	52,75	0,07	2	33,25	2,62	2
	0	0,22%	0,03%	2	50,95	0,64	2	43,1	2,69	2
G018107	60	нет данных	нет данных	2	99,50	0,14	2	89,05	0,07	2
	30	нет данных	нет данных	2	99,05	0,07	2	91,1	0,85	2
	15	нет данных	нет данных	2	97,05	0,64	2	90	3,25	2
	7,5	нет данных	нет данных	2	90,45	0,07	2	83,25	2,76	2

	3,75	нет данных	нет данных	2	79,60	0,99	2	72,3	2,4	2
	1,88	нет данных	нет данных	2	66,20	2,26	2	58,7	4,81	2
	0,94	нет данных	нет данных	2	53,40	1,41	2	45,55	3,89	2
	0	нет данных	нет данных	2	51,65	2,05	2	47,35	4,03	2
G018111	60	96,87%	0,26%	2	95,65	0,49	2	92,45	0,35	2
	30	95,44%	0,07%	2	89,40	0,71	2	86,5	0,42	2
	15	89,11%	0,91%	2	81,35	0,07	2	75,75	2,62	2
	7,5	71,93%	0,55%	2	70,05	3,32	2	61,15	0,21	2
	3,75	47,48%	0,33%	2	56,45	5,02	2	48,5	0,14	2
	1,88	25,72%	1,46%	2	59,00	3,11	2	44,95	0,07	2
	0,94	12,27%	0,79%	2	51,30	3,39	2	42,3	0,99	2
	0	0,15%	0,01%	2	51,00	3,25	2	45,1	1,41	2
G018116	60	86,65%	0,01%	2	92,95	0,35	2	87,7	0,42	2
	30	62,59%	0,13%	2	79,90	1,84	2	69,75	2,9	2
	15	40,44%	1,09%	2	69,90	0,71	2	60,15	1,34	2
	7,5	23,19%	2,46%	2	60,35	4,74	2	45,45	0,92	2
	3,75	10,65%	0,83%	2	55,45	1,91	2	40,2	1,41	2
	1,88	5,63%	0,47%	2	56,85	1,06	2	40,75	0,64	2
	0,94	1,93%	0,33%	2	57,80	3,96	2	40	0,14	2
	0	0,19%	0,10%	2	50,55	0,21	2	47	1,41	2
G018117	60	98,01%	0,17%	2	99,65	0,07	2	93,65	0,49	2
	30	97,14%	0,69%	2	99,20	0,14	2	92,35	0,07	2
	15	93,65%	0,39%	2	97,75	0,64	2	91,55	0,21	2
	7,5	81,77%	0,50%	2	91,60	0,42	2	81,85	0,35	2
	3,75	56,56%	2,70%	2	80,55	3,46	2	69,25	3,32	2
	1,88	33,70%	3,00%	2	69,30	1,13	2	56,8	2,69	2
	0,94	17,14%	0,83%	2	60,40	1,84	2	48,25	1,34	2
	0	0,18%	0,01%	2	51,95	2,76	2	46,5	1,13	2

G018118	60	98,36%	0,27%	2	99,65	0,07	2	94,35	0,49	2
	30	97,70%	0,19%	2	99,45	0,21	2	88,35	8,13	2
	15	94,59%	1,64%	2	98,30	0,14	2	90,45	0,21	2
	7,5	83,77%	2,47%	2	92,80	1,13	2	81,2	0,57	2
	3,75	64,07%	0,54%	2	81,25	1,06	2	71,5	1,56	2
	1,88	40,72%	2,16%	2	70,65	2,90	2	61,15	3,18	2
	0,94	22,33%	3,64%	2	63,90	0,85	2	51,05	2,76	2
	0	0,14%	0,02%	2	52,95	1,48	2	47,85	1,77	2
G018120	60	98,22%	0,32%	2	99,10	0,14	2	91,65	0,78	2
	30	96,96%	0,43%	2	99,15	0,07	2	89,1	0,57	2
	15	93,71%	0,19%	2	97,05	0,21	2	88,15	0,64	2
	7,5	82,19%	1,50%	2	90,25	0,78	2	80	0,99	2
	3,75	61,25%	1,50%	2	80,30	1,56	2	66,45	1,77	2
	1,88	37,98%	1,29%	2	68,85	0,78	2	52,75	3,04	2
	0,94	18,96%	0,67%	2	59,85	0,64	2	47,25	2,19	2
	0	0,17%	0,02%	2	49,60	0,57	2	46,1	0,99	2
G018121	60	97,55%	0,01%	2	97,25	0,35	2	87,45	0,35	2
	30	92,24%	0,98%	2	92,50	0,71	2	83,6	3,96	2
	15	78,58%	0,52%	2	84,90	0,28	2	76,85	2,9	2
	7,5	57,37%	0,50%	2	73,75	3,04	2	64,5	3,25	2
	3,75	35,06%	0,53%	2	60,70	0,00	2	50,5	3,25	2
	1,88	18,80%	2,81%	2	61,00	1,41	2	45,95	4,31	2
	0,94	9,25%	0,17%	2	56,95	4,31	2	42,8	1,7	2
	0	0,21%	0,00%	2	47,45	3,04	2	44,55	1,34	2

Пример 13. Нецелевой анализ CIITA-сплайсинг-направляющих

[00497] Т-клетки из Примера 10 подвергали скринингу для проверки нецелевых геномных сайтов, нацеленных на CIITA, и проводили в соответствии с протоколом IDT rhAmpSeq rhPCR Integrated DNA Technologies. В этом эксперименте 3 онРНК, нацеленные на CIITA, подвергали скринингу для валидации нецелевых профилей. Количество подтвержденных нецелевых сайтов для направляющих онРНК, нацеленных на CIITA (G018082, G018081 и G018034), показано в **Таблице 22**. Нецелевые сайты валидировали, если значение p было менее 0,05 процента индела. Из 108 нецелевых сайтов, идентифицированных для нацеливающей онРНК G018082, 0 сайтов были валидированы. Из 111 нецелевых сайтов, идентифицированных для нацеливающей онРНК G018081, 3

сайта были валидированы. Из 120 нецелевых сайтов, идентифицированных для нацеливающей онРНК G018034, 0 сайта были валидированы.

[00498] **Таблица 22. Валидация нецелевого сайта CIITA-сплайсинг-направляющих**

ID нРНК	Цель	Направляющая последовательность	(SEQ ID NO)	Нецелевые сайты	Валидированные сайты
G018082	CIITA	UGUGUCACCCGUUUCAGGUG	62	108	0
G018081	CIITA	CUGUGUCACCCGUUUCAGGU	61	111	3
G018034	CIITA	AGGGAGGCUUAUGCCAAUAU	14	120	0

Дополнительные варианты осуществления

[00499] Изобретение дополнительно включает следующие варианты осуществления.

[00500] Вариант осуществления 1 представляет собой сконструированную клетку, в которой снижена или устранена поверхностная экспрессия MHC класса II по сравнению с немодифицированной клеткой, содержащую генетическую модификацию в гене CIITA, где генетическая модификация содержит по меньшей мере один нуклеотид сайта сплайсинга в пределах геномных координат chr16:10902171-10923242.

[00501] Вариант осуществления 2 представляет собой сконструированную клетку по варианту осуществления 1, в которой генетическая модификация включает модификацию по меньшей мере одного нуклеотида акцепторного сайта сплайсинга.

[00502] Вариант осуществления 3 представляет собой сконструированную клетку по варианту осуществления 2, в которой один нуклеотид представляет собой A.

[00503] Вариант осуществления 4 представляет собой сконструированную клетку по варианту осуществления 2, в которой один нуклеотид представляет собой G.

[00504] Вариант осуществления 5 представляет собой сконструированную клетку по варианту осуществления 1, в которой генетическая модификация включает модификацию по меньшей мере одного нуклеотида донорного сайта сплайсинга.

[00505] Вариант осуществления 6 представляет собой сконструированную клетку по варианту осуществления 5, в которой один нуклеотид представляет собой G.

[00506] Вариант осуществления 7 представляет собой сконструированную клетку по варианту осуществления 5, в которой один нуклеотид представляет собой T.

[00507] Вариант осуществления 8 представляет собой сконструированную клетку в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, в которой генетическая модификация включает модификацию нуклеотида, граничащего с сайтом сплайсинга.

[00508] Вариант осуществления 9 представляет собой сконструированную клетку в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, в которой генетическая

модификация включает по меньшей мере 5 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат chr16:10902171-10923242.

[00509] Вариант осуществления 10 представляет собой сконструированную клетку в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, в которой генетическая модификация включает по меньшей мере 6, 7, 8, 9 или 10 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат chr16:10902171-10923242.

[00510] Вариант осуществления 11 представляет собой сконструированную клетку в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, в которой генетическая модификация содержит по меньшей мере одну замену C на T или по меньшей мере одну замену A на G в пределах геномных координат chr16:10902171-10923242.

[00511] Вариант осуществления 12 представляет собой сконструированную клетку по варианту осуществления 1, в которой генетическая модификация содержит по меньшей мере один нуклеотид сайта сплайсинга в пределах геномных координат chr16:10903873-10923242.

[00512] Вариант осуществления 13 представляет собой сконструированную клетку по любому из предыдущих вариантов осуществления, в которой генетическая модификация содержит по меньшей мере один нуклеотид сайта сплайсинга в пределах геномных координат chr:16:10906485-10923242.

[00513] Вариант осуществления 14 представляет собой сконструированную клетку в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, в которой генетическая модификация содержит по меньшей мере один нуклеотид сайта сплайсинга в пределах геномных координат chr16:10908130-10923242.

[00514] Вариант осуществления 15 представляет собой сконструированную клетку в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, в которой генетическая модификация включает по меньшей мере один нуклеотид сайта сплайсинга в пределах геномных координат, выбранных из: chr16:10908132-10908152, chr16:10908131-10908151, chr16:10916456-10916476, chr16:10918504-10918524, chr16:10909022-10909042, chr16:10918512-10918532, chr16:10918511-10918531, chr16:10895742-10895762, chr16:10916362-10916382, chr16:10916455-10916475, chr16:10909172-10909192, chr16:10906492-10906512, chr16:10909006-10909026, chr16:10922478-10922498, chr16:10895747-10895767, chr16:10916348-10916368, chr16:10910186-10910206, chr16:10906481-10906501, chr16:10909007-10909027, chr16:10895410-10895430 и chr16:10908130-10908150.

[00515] Вариант осуществления 16 представляет собой сконструированную клетку в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, в которой генетическая модификация включает по меньшей мере один нуклеотид сайта сплайсинга в пределах геномных координат, выбранных из: chr16:10908132-10908152, chr16:10908131-10908151, chr16:10916456-10916476, chr16:10918504-10918524, chr16:10909022-10909042, chr16:10918512-10918532, chr16:10918511-10918531, chr16:10895742-10895762,

chr16:10916362-10916382, chr16:10916455-10916475, chr16:10909172-10909192, chr16:10906492-10906512, chr16:10909006-10909026 и chr16:10922478-10922498.

[00516] Вариант осуществления 17 представляет собой сконструированную клетку по любому из предыдущих вариантов осуществления, в которой генетическая модификация содержит по меньшей мере один нуклеотид сайта сплайсинга в пределах геномных координат, выбранных из: chr16:10908132-10908152, chr16:10908131-10908151, chr16:10916456-10916476 и chr16:10918504-10918524.

[00517] Вариант осуществления 18 представляет собой сконструированную клетку в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, в которой генетическая модификация содержит по меньшей мере один нуклеотид сайта сплайсинга в пределах геномных координат chr16:10908132-10908152.

[00518] Вариант осуществления 19 представляет собой сконструированную клетку в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, в которой генетическая модификация содержит по меньшей мере один нуклеотид сайта сплайсинга в пределах геномных координат chr16:10908131-10908151.

[00519] Вариант осуществления 20 представляет собой сконструированную клетку в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, в которой генетическая модификация содержит по меньшей мере один нуклеотид сайта сплайсинга в пределах геномных координат chr16:10916456-10916476.

[00520] Вариант осуществления 21 представляет собой сконструированную клетку в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, в которой генетическая модификация содержит по меньшей мере один нуклеотид сайта сплайсинга в пределах геномных координат chr16:10918504-10918524.

[00521] Вариант осуществления 22 представляет собой сконструированную клетку в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, в которой генетическая модификация содержит по меньшей мере один нуклеотид сайта сплайсинга в пределах геномных координат, выбранных из: chr16:10918504-10918524, chr16:10923218-10923238, chr16:10923219-10923239, chr16:10923221-10923241, chr16:10906486-10906506, chr16:10906485-10906505, chr16:10903873-10903893, chr16:10909172-10909192, chr16:10918423-10918443, chr16:10916362-10916382, chr16:10916450-10916470, chr16:10922153-10922173, chr16:10923222-10923242, chr16:10910176-10910196, chr16:10895742-10895762, chr16:10916449-10916469, chr16:10923214-10923234, chr16:10906492-10906512 и chr16:10906487-10906507.

[00522] Вариант осуществления 23 представляет собой сконструированную клетку в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, в которой генетическая модификация содержит по меньшей мере один нуклеотид сайта сплайсинга в пределах геномных координат, выбранных из: chr16:10918504-10918524, chr16:10923218-10923238, chr16:10923219-10923239, chr16:10923221-10923241, chr16:10906486-10906506, chr16:10906485-10906505, chr16:10903873-10903893, chr16:10909172-10909192, chr16:10918423-10918443, chr16:10916362-10916382, chr16:10916450-10916470 и

chr16:10922153-10922173.

[00523] Вариант 24 представляет собой сконструированную клетку в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, в которой генетическая модификация содержит по меньшей мере один нуклеотид сайта сплайсинга в пределах геномных координат, выбранных из: chr16:10918504-10918524, chr16:10923218-10923238 и chr16:10923219-10923239.

[00524] Вариант осуществления 25 представляет собой сконструированную клетку в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, в которой генетическая модификация содержит по меньшей мере один нуклеотид сайта сплайсинга в пределах геномных координат chr16:10918504-10918524.

[00525] Вариант осуществления 26 представляет собой сконструированную клетку в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, в которой генетическая модификация содержит по меньшей мере один нуклеотид сайта сплайсинга в пределах геномных координат chr16:10923218-10923238.

[00526] Вариант осуществления 27 представляет собой сконструированную клетку в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, в которой генетическая модификация содержит по меньшей мере один нуклеотид сайта сплайсинга в пределах геномных координат chr16:10923219-10923239.

[00527] Вариант осуществления 28 представляет собой сконструированную клетку, в которой снижена или устранена поверхностная экспрессия MHC класса II по сравнению с немодифицированной клеткой, содержащую генетическую модификацию в гене CIITA, в которой генетическая модификация содержит индел, замену C на T или замену A на G в пределах геномных координат, выбранных из: chr16:10895410-10895430, chr16:10898649-10898669, chr16:10898658-10898678, chr16:10902171-10902191, chr16:10902173-10902193, chr16:10902174-10902194, chr16:10902179-10902199, chr16:10902183-10902203, chr16:10902184-10902204, chr16:10902644-10902664, chr16:10902779-10902799, chr16:10902788-10902808, chr16:10902789-10902809, chr16:10902790-10902810, chr16:10902795-10902815, chr16:10902799-10902819, chr16:10903708-10903728, chr16:10903713-10903733, chr16:10903718-10903738, chr16:10903721-10903741, chr16:10903723-10903743, chr16:10903724-10903744, chr16:10903873-10903893, chr16:10903878-10903898, chr16:10903905-10903925, chr16:10903906-10903926, chr16:10904736-10904756, chr16:10904790-10904810, chr16:10904811-10904831, chr16:10906481-10906501, chr16:10906485-10906505, chr16:10906486-10906506, chr16:10906487-10906507, chr16:10906492-10906512, chr16:10908127-10908147, chr16:10908130-10908150, chr16:10908131-10908151, chr16:10908132-10908152, chr16:10908137-10908157, chr16:10908138-10908158, chr16:10908139-10908159, chr16:10909006-10909026, chr16:10909007-10909027, chr16:10909018-10909038, chr16:10909021-10909041, chr16:10909022-10909042, chr16:10909172-10909192, chr16:10910165-10910185, chr16:10910176-10910196, chr16:10910186-10910206, chr16:10915547-10915567, chr16:10915551-10915571, chr16:10915552-10915572,

chr16:10915567-10915587, chr16:10916348-10916368, chr16:10916359-10916379, chr16:10916362-10916382, chr16:10916449-10916469, chr16:10916450-10916470, chr16:10916455-10916475, chr16:10916456-10916476, chr16:10918423-10918443, chr16:10918504-10918524, chr16:10918511-10918531, chr16:10918512-10918532, chr16:10918539-10918559, chr16:10922153-10922173, chr16:10922478-10922498, chr16:10922487-10922507, chr16:10922499-10922519, chr16:10923205-10923225, chr16:10923214-10923234, chr16:10923218-10923238, chr16:10923219-10923239, chr16:10923220-10923240, chr16:10923221-10923241 и chr16:10923222-10923242.

[00528] Вариант осуществления 29 представляет собой сконструированную клетку по варианту осуществления 28, в которой генетическая модификация включает по меньшей мере один нуклеотид сайта сплайсинга в пределах геномных координат, выбранных из: chr16:10908132-10908152, chr16:10908131-10908151, chr16:10916456-10916476, chr16:10918504-10918524, chr16:10909022-10909042, chr16:10918512-10918532, chr16:10918511-10918531, chr16:10895742-10895762, chr16:10916362-10916382, chr16:10916455-10916475, chr16:10909172-10909192, chr16:10906492-10906512, chr16:10909006-10909026, chr16:10922478-10922498, chr16:10895747-10895767, chr16:10916348-10916368, chr16:10910186-10910206, chr16:10906481-10906501, chr16:10909007-10909027, chr16:10895410-10895430 и chr16:10908130-10908150.

[00529] Вариант осуществления 30 представляет собой сконструированную клетку по варианту осуществления 28, в которой генетическая модификация включает по меньшей мере один нуклеотид сайта сплайсинга в пределах геномных координат, выбранных из: chr16:10908132-10908152, chr16:10908131-10908151, chr16:10916456-10916476, chr16:10918504-10918524, chr16:10909022-10909042, chr16:10918512-10918532, chr16:10918511-10918531, chr16:10895742-10895762, chr16:10916362-10916382, chr16:10916455-10916475, chr16:10909172-10909192, chr16:10906492-10906512, chr16:10909006-10909026 и chr16:10922478-10922498.

[00530] Вариант осуществления 31 представляет собой сконструированную клетку по варианту осуществления 28, в которой генетическая модификация содержит по меньшей мере один нуклеотид сайта сплайсинга в пределах геномных координат, выбранных из: chr16:10908132-10908152, chr16:10908131-10908151, chr16:10916456-10916476 и chr16:10918504-10918524.

[00531] Вариант осуществления 32 представляет собой сконструированную клетку по варианту осуществления 28, в которой генетическая модификация содержит по меньшей мере один нуклеотид сайта сплайсинга в пределах геномных координат, выбранных из: chr16:10918504-10918524, chr16:10923218-10923238, chr16:10923219-10923239, chr16:10923221-10923241, chr16:10906486-10906506, chr16:10906485-10906505, chr16:10903873-10903893, chr16:10909172-10909192, chr16:10918423-10918443, chr16:10916362-10916382, chr16:10916450-10916470, chr16:10922153-10922173, chr16:10923222-10923242, chr16:10910176-10910196, chr16:10895742-10895762, chr16:10916449-10916469, chr16:10923214-10923234, chr16:10906492-10906512 и

chr16:10906487-10906507.

[00532] Вариант осуществления 33 представляет собой сконструированную клетку по варианту осуществления 28, в которой генетическая модификация содержит по меньшей мере один нуклеотид сайта сплайсинга в пределах геномных координат, выбранных из: chr16:10918504-10918524, chr16:10923218-10923238, chr16:10923219-10923239, chr16:10923221-10923241, chr16:10906486-10906506, chr16:10906485-10906505, chr16:10903873-10903893, chr16:10909172-10909192, chr16:10918423-10918443, chr16:10916362-10916382, chr16:10916450-10916470 и chr16:10922153-10922173.

[00533] Вариант осуществления 34 представляет собой сконструированную клетку по варианту осуществления 28, в которой генетическая модификация содержит по меньшей мере один нуклеотид сайта сплайсинга в пределах геномных координат, выбранных из: chr16:10918504-10918524, chr16:10923218-10923238 и chr16:10923219-10923239.

[00534] Вариант осуществления 35 представляет собой сконструированную клетку в соответствии с любым из вариантов осуществления 28-34, в которой генетическая модификация включает по меньшей мере 5 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат.

[00535] Вариант осуществления 36 представляет собой сконструированную клетку в соответствии с любым из вариантов осуществления 28-35, в которой генетическая модификация включает по меньшей мере 6, 7, 8, 9 или 10 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат.

[00536] Вариант осуществления 37 представляет собой сконструированную клетку в соответствии с любым из вариантов осуществления 28-36, в которой генетическая модификация содержит по меньшей мере одну замену C на T или по меньшей мере одну замену A на G в пределах геномных координат.

[00537] Вариант осуществления 38 представляет собой сконструированную клетку в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, в которой экспрессия MHC класса II снижена или устранена с помощью системы редактирования генов, которая связывается с геномной целевой последовательностью CIITA, содержащей по меньшей мере 5 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат, выбранных из: chr16:10895410-10895430, chr16:10898649-10898669, chr16:10898658-10898678, chr16:10902171-10902191, chr16:10902173-10902193, chr16:10902174-10902194, chr16:10902179-10902199, chr16:10902183-10902203, chr16:10902184-10902204, chr16:10902644-10902664, chr16:10902779-10902799, chr16:10902788-10902808, chr16:10902789-10902809, chr16:10902790-10902810, chr16:10902795-10902815, chr16:10902799-10902819, chr16:10903708-10903728, chr16:10903713-10903733, chr16:10903718-10903738, chr16:10903721-10903741, chr16:10903723-10903743, chr16:10903724-10903744, chr16:10903873-10903893, chr16:10903878-10903898, chr16:10903905-10903925, chr16:10903906-10903926, chr16:10904736-10904756, chr16:10904790-10904810, chr16:10904811-10904831, chr16:10906481-10906501,

chr16:10906485-10906505, chr16:10906486-10906506, chr16:10906487-10906507, chr16:10906492-10906512, chr16:10908127-10908147, chr16:10908130-10908150, chr16:10908131-10908151, chr16:10908132-10908152, chr16:10908137-10908157, chr16:10908138-10908158, chr16:10908139-10908159, chr16:10909006-10909026, chr16:10909007-10909027, chr16:10909018-10909038, chr16:10909021-10909041, chr16:10909022-10909042, chr16:10909172-10909192, chr16:10910165-10910185, chr16:10910176-10910196, chr16:10910186-10910206, chr16:10915547-10915567, chr16:10915551-10915571, chr16:10915552-10915572, chr16:10915567-10915587, chr16:10916348-10916368, chr16:10916359-10916379, chr16:10916362-10916382, chr16:10916449-10916469, chr16:10916450-10916470, chr16:10916455-10916475, chr16:10916456-10916476, chr16:10918423-10918443, chr16:10918504-10918524, chr16:10918511-10918531, chr16:10918512-10918532, chr16:10918539-10918559, chr16:10922153-10922173, chr16:10922478-10922498, chr16:10922487-10922507, chr16:10922499-10922519, chr16:10923205-10923225, chr16:10923214-10923234, chr16:10923218-10923238, chr16:10923219-10923239, chr16:10923220-10923240, chr16:10923221-10923241 и chr16:10923222-10923242.

[00538] Вариант осуществления 39 представляет собой сконструированную клетку в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, в которой экспрессия MHC класса II снижена или устранена с помощью системы редактирования генов, которая связывается с геномной целевой последовательностью CIITA, содержащей по меньшей мере 5 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат, выбранных из: chr16:10903873-10903893, chr16:10903878-10903898, chr16:10903905-10903925, chr16:10903906-10903926, chr16:10904736-10904756, chr16:10904790-10904810, chr16:10904811-10904831, chr16:10906481-10906501, chr16:10906485-10906505, chr16:10906486-10906506, chr16:10906487-10906507, chr16:10906492-10906512, chr16:10908127-10908147, chr16:10908130-10908150, chr16:10908131-10908151, chr16:10908132-10908152, chr16:10908137-10908157, chr16:10908138-10908158, chr16:10908139-10908159, chr16:10909006-10909026, chr16:10909007-10909027, chr16:10909018-10909038, chr16:10909021-10909041, chr16:10909022-10909042, chr16:10909172-10909192, chr16:10910165-10910185, chr16:10910176-10910196, chr16:10910186-10910206, chr16:10915547-10915567, chr16:10915551-10915571, chr16:10915552-10915572, chr16:10915567-10915587, chr16:10916348-10916368, chr16:10916359-10916379, chr16:10916362-10916382, chr16:10916449-10916469, chr16:10916450-10916470, chr16:10916455-10916475, chr16:10916456-10916476, chr16:10918423-10918443, chr16:10918504-10918524, chr16:10918511-10918531, chr16:10918512-10918532, chr16:10918539-10918559, chr16:10922153-10922173, chr16:10922478-10922498, chr16:10922487-10922507, chr16:10922499-10922519, chr16:10923205-10923225, chr16:10923214-10923234, chr16:10923218-10923238, chr16:10923219-10923239, chr16:10923220-10923240, chr16:10923221-10923241 и chr16:10923222-10923242.

[00539] Вариант осуществления 40 представляет собой сконструированную клетку в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, в которой экспрессия MHC класса II снижена или устранена с помощью системы редактирования генов, которая связывается с геномной целевой последовательностью CIITA, содержащей по меньшей мере 5 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат, выбранных из: chr16:10906485-10906505, chr16:10906486-10906506, chr16:10906487-10906507, chr16:10906492-10906512, chr16:10908127-10908147, chr16:10908130-10908150, chr16:10908131-10908151, chr16:10908132-10908152, chr16:10908137-10908157, chr16:10908138-10908158, chr16:10908139-10908159, chr16:10909006-10909026, chr16:10909007-10909027, chr16:10909018-10909038, chr16:10909021-10909041, chr16:10909022-10909042, chr16:10909172-10909192, chr16:10910165-10910185, chr16:10910176-10910196, chr16:10910186-10910206, chr16:10915547-10915567, chr16:10915551-10915571, chr16:10915552-10915572, chr16:10915567-10915587, chr16:10916348-10916368, chr16:10916359-10916379, chr16:10916362-10916382, chr16:10916449-10916469, chr16:10916450-10916470, chr16:10916455-10916475, chr16:10916456-10916476, chr16:10918423-10918443, chr16:10918504-10918524, chr16:10918511-10918531, chr16:10918512-10918532, chr16:10918539-10918559, chr16:10922153-10922173, chr16:10922478-10922498, chr16:10922487-10922507, chr16:10922499-10922519, chr16:10923205-10923225, chr16:10923214-10923234, chr16:10923218-10923238, chr16:10923219-10923239, chr16:10923220-10923240, chr16:10923221-10923241 и chr16:10923222-10923242.

[00540] Вариант осуществления 41 представляет собой сконструированную клетку в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, в которой экспрессия MHC класса II снижена или устранена с помощью системы редактирования генов, которая связывается с геномной целевой последовательностью CIITA, содержащей по меньшей мере 5 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат, выбранных из: chr16:10908130-10908150, chr16:10908131-10908151, chr16:10908132-10908152, chr16:10908137-10908157, chr16:10908138-10908158, chr16:10908139-10908159, chr16:10909006-10909026, chr16:10909007-10909027, chr16:10909018-10909038, chr16:10909021-10909041, chr16:10909022-10909042, chr16:10909172-10909192, chr16:10910165-10910185, chr16:10910176-10910196, chr16:10910186-10910206, chr16:10915547-10915567, chr16:10915551-10915571, chr16:10915552-10915572, chr16:10915567-10915587, chr16:10916348-10916368, chr16:10916359-10916379, chr16:10916362-10916382, chr16:10916449-10916469, chr16:10916450-10916470, chr16:10916455-10916475, chr16:10916456-10916476, chr16:10918423-10918443, chr16:10918504-10918524, chr16:10918511-10918531, chr16:10918512-10918532, chr16:10918539-10918559, chr16:10922153-10922173, chr16:10922478-10922498, chr16:10922487-10922507, chr16:10922499-10922519, chr16:10923205-10923225, chr16:10923214-10923234, chr16:10923218-10923238, chr16:10923219-10923239, chr16:10923220-10923240, chr16:10923221-10923241 и chr16:10923222-10923242.

[00541] Вариант осуществления 42 представляет собой сконструированную клетку в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, в которой экспрессия MHC класса II снижена или устранена с помощью системы редактирования генов, которая связывается с геномной целевой последовательностью CIITA, содержащей по меньшей мере 5 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат, выбранных из: chr16:10908132-10908152, chr16:10908131-10908151, chr16:10916456-10916476, chr16:10918504-10918524, chr16:10909022-10909042, chr16:10918512-10918532, chr16:10918511-10918531, chr16:10895742-10895762, chr16:10916362-10916382, chr16:10916455-10916475, chr16:10909172-10909192, chr16:10906492-10906512, chr16:10909006-10909026, chr16:10922478-10922498, chr16:10895747-10895767, chr16:10916348-10916368, chr16:10910186-10910206, chr16:10906481-10906501, chr16:10909007-10909027, chr16:10895410-10895430 и chr16:10908130-10908150.

[00542] Вариант осуществления 43 представляет собой сконструированную клетку в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, в которой экспрессия MHC класса II снижена или устранена с помощью системы редактирования генов, которая связывается с геномной целевой последовательностью CIITA, содержащей по меньшей мере 5 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат, выбранных из: chr16:10908132-10908152, chr16:10908131-10908151, chr16:10916456-10916476, chr16:10918504-10918524, chr16:10909022-10909042, chr16:10918512-10918532, chr16:10918511-10918531, chr16:10895742-10895762, chr16:10916362-10916382, chr16:10916455-10916475, chr16:10909172-10909192, chr16:10906492-10906512, chr16:10909006-10909026 и chr16:10922478-10922498.

[00543] Вариант осуществления 44 представляет собой сконструированную клетку в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, в которой экспрессия MHC класса II снижена или устранена с помощью системы редактирования генов, которая связывается с геномной целевой последовательностью CIITA, содержащей по меньшей мере 5 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат, выбранных из: chr16:10908132-10908152, chr16:10908131-10908151, chr16:10916456-10916476 и chr16:10918504-10918524.

[00544] Вариант осуществления 45 представляет собой сконструированную клетку в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, в которой экспрессия MHC класса II снижена или устранена с помощью системы редактирования генов, которая связывается с геномной целевой последовательностью CIITA, содержащей по меньшей мере 5 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат chr16:10908132-10908152.

[00545] Вариант осуществления 46 представляет собой сконструированную клетку в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, в которой экспрессия MHC класса II снижена или устранена с помощью системы редактирования генов, которая связывается с геномной целевой последовательностью CIITA, содержащей по меньшей мере 5 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат chr16:10908131-10908151.

[00546] Вариант осуществления 47 представляет собой сконструированную клетку

в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, в которой экспрессия MHC класса II снижена или устранена с помощью системы редактирования генов, которая связывается с геномной целевой последовательностью CIITA, содержащей по меньшей мере 5 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат chr16:10916456-10916476.

[00547] Вариант осуществления 48 представляет собой сконструированную клетку в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, в которой экспрессия MHC класса II снижена или устранена с помощью системы редактирования генов, которая связывается с геномной целевой последовательностью CIITA, содержащей по меньшей мере 5 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат chr16:10918504-10918524.

[00548] Вариант осуществления 49 представляет собой сконструированную клетку в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, в которой экспрессия MHC класса II снижена или устранена с помощью системы редактирования генов, которая связывается с геномной целевой последовательностью CIITA, содержащей по меньшей мере 5 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат, выбранных из: chr16:10918504-10918524, chr16:10923218-10923238, chr16:10923219-10923239, chr16:10923221-10923241, chr16:10906486-10906506, chr16:10906485-10906505, chr16:10903873-10903893, chr16:10909172-10909192, chr16:10918423-10918443, chr16:10916362-10916382, chr16:10916450-10916470, chr16:10922153-10922173, chr16:10923222-10923242, chr16:10910176-10910196, chr16:10895742-10895762, chr16:10916449-10916469, chr16:10923214-10923234, chr16:10906492-10906512 и chr16:10906487-10906507.

[00549] Вариант осуществления 50 представляет собой сконструированную клетку в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, в которой экспрессия MHC класса II снижена или устранена с помощью системы редактирования генов, которая связывается с геномной целевой последовательностью CIITA, содержащей по меньшей мере 5 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат, выбранных из: chr16:10918504-10918524, chr16:10923218-10923238, chr16:10923219-10923239, chr16:10923221-10923241, chr16:10906486-10906506, chr16:10906485-10906505, chr16:10903873-10903893, chr16:10909172-10909192, chr16:10918423-10918443, chr16:10916362-10916382, chr16:10916450-10916470 и chr16:10922153-10922173.

[00550] Вариант осуществления 51 представляет собой сконструированную клетку в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, в которой экспрессия MHC класса II снижена или устранена с помощью системы редактирования генов, которая связывается с геномной целевой последовательностью CIITA, содержащей по меньшей мере 5 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат, выбранных из: chr16:10918504-10918524, chr16:10923218-10923238 и chr16:10923219-10923239.

[00551] Вариант осуществления 52 представляет собой сконструированную клетку в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, в которой экспрессия MHC класса II снижена или устранена с помощью системы редактирования генов, которая связывается с геномной целевой последовательностью CIITA, содержащей по меньшей

мере 5 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат chr16:10918504-10918524.

[00552] Вариант осуществления 53 представляет собой сконструированную клетку в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, в которой экспрессия MHC класса II снижена или устранена с помощью системы редактирования генов, которая связывается с геномной целевой последовательностью CIITA, содержащей по меньшей мере 5 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат chr16:10923218-10923238.

[00553] Вариант осуществления 54 представляет собой сконструированную клетку в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, в которой экспрессия MHC класса II снижена или устранена с помощью системы редактирования генов, которая связывается с геномной целевой последовательностью CIITA, содержащей по меньшей мере 5 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат chr16:10923219-10923239.

[00554] Вариант осуществления 55 представляет собой сконструированную клетку в соответствии с любым из вариантов осуществления 38-54, в которой геномная целевая последовательность CIITA включает по меньшей мере 10 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат.

[00555] Вариант осуществления 56 представляет собой сконструированную клетку в соответствии с любым из вариантов осуществления 38-55, в которой геномная целевая последовательность CIITA включает по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат.

[00556] Вариант осуществления 57 представляет собой сконструированную клетку в соответствии с любым из вариантов осуществления 38-56, в которой система редактирования генов содержит РНК-направляемый ДНК-связывающий агент.

[00557] Вариант осуществления 58 представляет собой сконструированную клетку по варианту осуществления 57, в которой РНК-направляемый ДНК-связывающий агент содержит белок Cas9, такой как Cas9 S. pyogenes.

[00558] Вариант осуществления 59 представляет собой сконструированную клетку по любому из предыдущих вариантов осуществления, в которой генетическая модификация инактивирует сайт сплайсинга.

[00559] Вариант осуществления 60 представляет собой сконструированную клетку в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, в которой генетическая модификация включает делецию нуклеотида в сайте сплайсинга.

[00560] Вариант осуществления 61 представляет собой сконструированную клетку в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, в которой генетическая модификация включает замену нуклеотида в сайте сплайсинга.

[00561] Вариант осуществления 62 представляет собой сконструированную клетку в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, в которой сконструированная клетка дополнительно имеет сниженную или устраненную поверхностную экспрессию MHC класса I.

[00562] Вариант осуществления 63 представляет собой сконструированную клетку по любому из предыдущих вариантов осуществления, в которой сконструированная

клетка содержит генетическую модификацию гена бета-2-микроглобулина (B2M).

[00563] Вариант осуществления 64 представляет собой сконструированную клетку по любому из предыдущих вариантов осуществления, в которой сконструированная клетка содержит генетическую модификацию гена HLA-A.

[00564] Вариант осуществления 65 представляет собой сконструированную клетку по любому из предыдущих вариантов осуществления, в которой сконструированная клетка дополнительно содержит экзогенную нуклеиновую кислоту.

[00565] Вариант осуществления 66 представляет собой сконструированную клетку в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, в которой сконструированная клетка содержит экзогенную нуклеиновую кислоту, кодирующую нацеливающий рецептор, который экспрессируется на поверхности сконструированной клетки.

[00566] Вариант осуществления 67 представляет собой сконструированную клетку по варианту осуществления 66, в которой нацеливающий рецептор представляет собой CAR.

[00567] Вариант осуществления 68 представляет собой сконструированную клетку по варианту осуществления 66, в которой нацеливающий рецептор представляет собой TKP.

[00568] Вариант осуществления 69 представляет собой сконструированную клетку по варианту осуществления 66, в которой нацеливающий рецептор представляет собой TKP WT1.

[00569] Вариант осуществления 70 представляет собой сконструированную клетку по любому из предыдущих вариантов осуществления, в которой сконструированная клетка дополнительно содержит экзогенную нуклеиновую кислоту, кодирующую полипептид, который секретируется сконструированной клеткой.

[00570] Вариант осуществления 71 представляет собой сконструированную клетку в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, где сконструированная клетка представляет собой клетку человека.

[00571] Вариант осуществления 72 представляет собой сконструированную клетку в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, где сконструированная клетка представляет собой иммунную клетку.

[00572] Вариант осуществления 73 представляет собой сконструированную клетку по любому из предыдущих вариантов осуществления, где сконструированная клетка представляет собой моноцит, макрофаг, тучную клетку, дендритную клетку или гранулоцит.

[00573] Вариант осуществления 74 представляет собой сконструированную клетку по любому из предыдущих вариантов осуществления, где сконструированная клетка представляет собой лимфоцит.

[00574] Вариант осуществления 75 представляет собой сконструированную клетку по варианту осуществления 74, где сконструированная клетка представляет собой Т-

клетку.

[00575] Вариант осуществления 76 представляет собой сконструированную клетку по варианту осуществления 75, где сконструированная клетка дополнительно имеет сниженную или устраненную экспрессию белка эндогенного Т-клеточного рецептора (TKP) по сравнению с немодифицированной клеткой.

[00576] Вариант осуществления 77 представляет собой сконструированную клетку по варианту осуществления 76, в которой в клетке снижена или устранена экспрессия белка TRAC по сравнению с немодифицированной клеткой.

[00577] Вариант осуществления 78 представляет собой сконструированную клетку в соответствии с любым из вариантов осуществления 76-77, в которой клетка имеет сниженную экспрессию белка TRBC по сравнению с немодифицированной клеткой.

[00578] Вариант осуществления 79 представляет собой фармацевтическую композицию, содержащую сконструированную клетку по любому из предыдущих вариантов осуществления.

[00579] Вариант осуществления 80 представляет собой популяцию клеток, содержащую сконструированную клетку по любому из предыдущих вариантов осуществления.

[00580] Вариант осуществления 81 представляет собой фармацевтическую композицию, содержащую популяцию клеток, где популяция клеток включает сконструированную клетку по любому из предыдущих вариантов осуществления.

[00581] Вариант осуществления 82 представляет собой популяцию клеток по варианту осуществления 80 или фармацевтическую композицию по варианту осуществления 81, где популяция клеток по меньшей мере на 65% является отрицательной по MHC класса II, как измерено с помощью проточной цитометрии.

[00582] Вариант осуществления 83 представляет собой популяцию клеток по варианту осуществления 80 или фармацевтическую композицию по варианту осуществления 81, где популяция клеток по меньшей мере на 70% является отрицательной по MHC класса II, как измерено с помощью проточной цитометрии.

[00583] Вариант осуществления 84 представляет собой популяцию клеток по варианту осуществления 80 или фармацевтическую композицию по варианту осуществления 81, где популяция клеток по меньшей мере на 80% является отрицательной по MHC класса II, как измерено с помощью проточной цитометрии.

[00584] Вариант осуществления 85 представляет собой популяцию клеток по варианту осуществления 80 или фармацевтическую композицию по варианту осуществления 81, где популяция клеток по меньшей мере на 90% является отрицательной по MHC класса II, как измерено с помощью проточной цитометрии.

[00585] Вариант осуществления 86 представляет собой популяцию клеток по варианту осуществления 80 или фармацевтическую композицию по варианту осуществления 81, где популяция клеток по меньшей мере на 92% является отрицательной по MHC класса II, как измерено с помощью проточной цитометрии.

[00586] Вариант осуществления 87 представляет собой популяцию клеток по варианту осуществления 80 или фармацевтическую композицию по варианту осуществления 81, где популяция клеток по меньшей мере на 93% является отрицательной по MHC класса II, как измерено с помощью проточной цитометрии.

[00587] Вариант осуществления 88 представляет собой популяцию клеток по варианту осуществления 80 или фармацевтическую композицию по варианту осуществления 81, где популяция клеток по меньшей мере на 94% является отрицательной по MHC класса II, как измерено с помощью проточной цитометрии.

[00588] Вариант осуществления 89 представляет собой популяцию клеток или фармацевтическую композицию по любому из вариантов осуществления 80-88, где популяция клеток по меньшей мере на 95% является отрицательной по эндогенному белку TKP, как измерено с помощью проточной цитометрии.

[00589] Вариант осуществления 90 представляет собой популяцию клеток или фармацевтическую композицию по любому из вариантов осуществления 80-89, где популяция клеток по меньшей мере на 97% является отрицательной по эндогенному белку TKP, как измерено с помощью проточной цитометрии.

[00590] Вариант осуществления 91 представляет собой популяцию клеток или фармацевтическую композицию по любому из вариантов осуществления 80-90, где популяция клеток по меньшей мере на 98% является отрицательной по эндогенному белку TKP, как измерено с помощью проточной цитометрии.

[00591] Вариант осуществления 92 представляет собой популяцию клеток или фармацевтическую композицию по любому из вариантов осуществления 80-91, где популяция клеток по меньшей мере на 99% является отрицательной по эндогенному белку TKP, как измерено с помощью проточной цитометрии.

[00592] Вариант осуществления 93 представляет собой способ введения сконструированной клетки, популяции клеток или фармацевтической композиции в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления субъекту, нуждающемуся в этом.

[00593] Вариант осуществления 94 представляет собой способ введения сконструированной клетки, популяции клеток или фармацевтической композиции в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления субъекту в качестве терапии на основе адоптивного переноса клеток (АПК).

[00594] Вариант осуществления 95 представляет собой композицию, содержащую: а) CIITA-направленную РНК, содержащую направляющую последовательность, которая i) нацелена на геномную целевую последовательность CIITA, содержащую по меньшей мере один нуклеотид сайта сплайсинга, или ii) направляет РНК-направляемый ДНК-связывающий агент сделать разрез в геномной целевой последовательности CIITA, которая находится на расстоянии 5 нуклеотидов или менее от нуклеотида, граничащего с сайтом сплайсинга; где CIITA-направленная РНК нацелена на геномную целевую последовательность CIITA, содержащую по меньшей мере 10 смежных нуклеотидов в

пределах геномных координат chr16:10902171-10923242.

[00595] Вариант осуществления 96 представляет собой композицию, содержащую: a) CIITA-направленную РНК (нРНК), содержащую i) направляющую последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1-101; или ii) по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 1-101; или iii) направляющую последовательность, по меньшей мере на 95%, 90% или 85% идентичную последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 1-101; или iv) последовательность, которая включает 10 смежных нуклеотидов ±10 нуклеотидов геномных координат, указанных в Таблице 1; или v) по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов последовательности из (iv); или vi) направляющую последовательность, которая по меньшей мере на 95%, 90% или 85% идентична последовательности, выбранной из (v).

[00596] Вариант осуществления 97 представляет собой композицию, содержащую: a) CIITA-направленную РНК, которая представляет собой одиночную направляющую РНК (онРНК), содержащую i) направляющую последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1-101; или ii) по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 1-101; или iii) направляющую последовательность, по меньшей мере на 95%, 90% или 85% идентичную последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 1-101; или iv) последовательность, которая включает 10 смежных нуклеотидов ±10 нуклеотидов геномных координат, указанных в Таблице 1; или v) по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов последовательности из (iv); или vi) направляющую последовательность, которая по меньшей мере на 95%, 90% или 85% идентична последовательности, выбранной из (v).

[00597] Вариант осуществления 98 представляет собой композицию в соответствии с любым из вариантов осуществления 95-97, в которой CIITA-направленная РНК представляет собой РНК-направляемый Cas9 S. pyogenes.

[00598] Вариант осуществления 99 представляет собой композицию в соответствии с любым из вариантов осуществления 95-98, дополнительно содержащую РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, или нуклеиновую кислоту, кодирующую РНК-направляемый ДНК-связывающий агент.

[00599] Вариант осуществления 100 представляет собой композицию по варианту осуществления 99, в которой нуклеиновая кислота, кодирующая РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, представляет собой мРНК, кодирующую РНК-направляемый ДНК-связывающий агент.

[00600] Вариант осуществления 101 представляет собой композицию в соответствии с любым из вариантов осуществления 99-100, в которой РНК-направляемый ДНК-связывающий агент содержит Cas9 S. pyogenes.

[00601] Вариант осуществления 102 представляет собой композицию в соответствии с любым из вариантов осуществления 99-101, в которой РНК-направляемый ДНК-связывающий агент содержит деаминазную область.

[00602] Вариант осуществления 103 представляет собой композицию в

соответствии с любым из вариантов осуществления 99-101, в которой РНК-направляемый ДНК-связывающий агент содержит деаминазу APOBEC3A (A3A) и РНК-направляемую никазу.

[00603] Вариант осуществления 104 представляет собой композицию варианта осуществления 103, в которой РНК-направляемая никаза представляет собой никазу Cas9 S. pyogenes.

[00604] Вариант осуществления 105 представляет собой композицию в соответствии с любым из вариантов осуществления 102-104, дополнительно содержащую ингибитор урацилгликозилазы (UGI).

[00605] Вариант осуществления 106 представляет собой композицию в соответствии с любым из вариантов осуществления 102-105, в которой РНК-направляемый ДНК-связывающий агент вызывает превращение цитозина (C) в тимин (T) в геномной целевой последовательности CIITA.

[00606] Вариант осуществления 107 представляет собой композицию в соответствии с любым из вариантов осуществления 102-105, в которой РНК-направляемый ДНК-связывающий агент вызывает превращение аденина (A) в гуанин (G) в геномной целевой последовательности CIITA.

[00607] Вариант осуществления 108 представляет собой композицию в соответствии с любым из вариантов осуществления 99-107, в которой CIITA-направленная РНК нацелена на геномную целевую последовательность CIITA, которая содержит по меньшей мере один нуклеотид акцепторного сайта сплайсинга.

[00608] Вариант осуществления 109 представляет собой композицию варианта осуществления 108, в которой один нуклеотид представляет собой A.

[00609] Вариант осуществления 110 представляет собой композицию по варианту осуществления 108, в которой один нуклеотид представляет собой G.

[00610] Вариант осуществления 111 представляет собой композицию варианта осуществления 108, в которой один нуклеотид представляет собой нуклеотид, граничащий с сайтом сплайсинга, в акцепторном сайте сплайсинга.

[00611] Вариант осуществления 112 представляет собой композицию в соответствии с любым из вариантов осуществления 99-107, в которой CIITA-направленная РНК нацелена на геномную целевую последовательность CIITA, которая содержит по меньшей мере один нуклеотид донорного сайта сплайсинга.

[00612] Вариант осуществления 113 представляет собой композицию по варианту осуществления 112, в которой один нуклеотид представляет собой G.

[00613] Вариант осуществления 114 представляет собой композицию варианта осуществления 112, в которой один нуклеотид представляет собой T.

[00614] Вариант осуществления 115 представляет собой композицию по варианту осуществления 112, в которой один нуклеотид представляет собой нуклеотид, граничащий с сайтом сплайсинга, в донорном сайте сплайсинга.

[00615] Вариант осуществления 116 представляет собой композицию в

соответствии с любым из вариантов осуществления 99-115, в которой CIITA-направленная РНК содержит направляющую последовательность, которая направляет РНК-направляемый ДНК-связывающий агент сделать разрез в геномной целевой последовательности CIITA, которая находится на расстоянии 4 нуклеотидов или менее от нуклеотида, граничащего с сайтом сплайсинга.

[00616] Вариант осуществления 117 представляет собой композицию в соответствии с любым из вариантов осуществления 99-115, в которой CIITA-направленная РНК содержит направляющую последовательность, которая направляет РНК-направляемый ДНК-связывающий агент сделать разрез в геномной целевой последовательности CIITA, которая находится на расстоянии 3 нуклеотидов или менее от нуклеотида, граничащего с сайтом сплайсинга.

[00617] Вариант осуществления 118 представляет собой композицию в соответствии с любым из вариантов осуществления 99-117, в которой CIITA-направленная РНК содержит направляющую последовательность, которая направляет РНК-направляемый ДНК-связывающий агент сделать разрез в геномной целевой последовательности CIITA, которая находится на расстоянии 2 нуклеотидов или менее от нуклеотида, граничащего с сайтом сплайсинга.

[00618] Вариант осуществления 119 представляет собой композицию в соответствии с любым из вариантов осуществления 99-118, в которой CIITA-направленная РНК содержит направляющую последовательность, которая направляет РНК-направляемый ДНК-связывающий агент сделать разрез в геномной целевой последовательности CIITA, которая находится на расстоянии 1 нуклеотид или менее от нуклеотида, граничащего с сайтом сплайсинга.

[00619] Вариант осуществления 120 представляет собой композицию в соответствии с любым из вариантов осуществления 99-119, в которой CIITA-направленная РНК содержит направляющую последовательность, которая направляет РНК-направляемый ДНК-связывающий агент сделать разрез в геномной целевой последовательности CIITA по нуклеотиду, граничащему с сайтом сплайсинга.

[00620] Вариант осуществления 121 представляет собой способ получения сконструированной клетки, в которой снижена или устранена поверхностная экспрессия белка MHC класса II по сравнению с немодифицированной клеткой, включающий приведение клетки в контакт с композицией в соответствии с любым из вариантов осуществления 99-120.

[00621] Вариант осуществления 122 представляет собой способ снижения поверхностной экспрессии белка MHC класса II в сконструированной клетке по сравнению с немодифицированной клеткой, включающий приведение клетки в контакт с композицией в соответствии с любым из вариантов осуществления 99-120.

[00622] Вариант осуществления 123 представляет собой способ по любому из вариантов осуществления 121-122, дополнительно включающий снижение или устранение поверхностной экспрессии белка MHC класса I в клетке по сравнению с

немодифицированной клеткой.

[00623] Вариант осуществления 124 представляет собой способ по любому из вариантов осуществления 121-122, дополнительно включающий снижение или устранение поверхностной экспрессии белка B2M в клетке по сравнению с немодифицированной клеткой.

[00624] Вариант осуществления 125 представляет собой способ по любому из вариантов осуществления 121-122, дополнительно включающий снижение или устранение поверхностной экспрессии белка HLA-A в клетке по сравнению с немодифицированной клеткой.

[00625] Вариант осуществления 126 представляет собой способ по любому из вариантов осуществления 122-125, дополнительно включающий снижение или устранение поверхностной экспрессии белка TKP в клетке по сравнению с немодифицированной клеткой.

[00626] Вариант осуществления 127 представляет собой способ по любому из вариантов осуществления 122-126, дополнительно включающий приведение клетки в контакт с экзогенной нуклеиновой кислотой.

[00627] Вариант осуществления 128 представляет собой способ по варианту осуществления 127, дополнительно включающий приведение клетки в контакт с экзогенной нуклеиновой кислотой, кодирующей нацеливающий рецептор.

[00628] Вариант осуществления 129 представляет собой способ по варианту осуществления 127, дополнительно включающий приведение клетки в контакт с экзогенной нуклеиновой кислотой, кодирующей полипептид, секретируемый клеткой.

[00629] Вариант осуществления 130 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ по любому из предыдущих вариантов осуществления, где клетка представляет собой аллогенную клетку.

[00630] Вариант осуществления 131 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ по любому из предыдущих вариантов осуществления, где клетка представляет собой первичную клетку.

[00631] Вариант осуществления 132 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ по любому из предыдущих вариантов осуществления, где клетка представляет собой Т-клетку CD4+.

[00632] Вариант осуществления 133 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ по любому из предыдущих вариантов осуществления, где клетка представляет собой Т-клетку CD8+.

[00633] Вариант осуществления 134 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ по любому из предыдущих вариантов осуществления, где клетка представляет собой Т-клетку памяти.

[00634] Вариант осуществления 135 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ по любому из

предыдущих вариантов осуществления, где клетка представляет собой В-клетку.

[00635] Вариант осуществления 136 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ по любому из предыдущих вариантов осуществления, где клетка представляет собой плазматическую В-клетку.

[00636] Вариант осуществления 137 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ по любому из предыдущих вариантов осуществления, где клетка представляет собой В-клетку памяти.

[00637] Вариант осуществления 138 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ по любому из предыдущих вариантов осуществления, где клетка представляет собой гемопоэтическую стволовую клетку (ГСК).

[00638] Вариант осуществления 139 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ по любому из предыдущих вариантов осуществления, где клетка представляет собой активированную клетку.

[00639] Вариант осуществления 140 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ по любому из предыдущих вариантов осуществления, где клетка представляет собой неактивированную клетку.

[00640] Вариант осуществления 141 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ по любому из предыдущих вариантов осуществления, включающие экзогенную нуклеиновую кислоту или приведение клетки в контакт с экзогенной нуклеиновой кислотой, где экзогенная нуклеиновая кислота кодирует молекулу ингибитора NK-клеток.

[00641] Вариант осуществления 142 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, включающие экзогенную нуклеиновую кислоту или приведение клетки в контакт с экзогенной нуклеиновой кислотой, где экзогенная нуклеиновая кислота кодирует молекулу ингибитора NK-клеток, где молекула ингибитора NK-клетки связывается с ингибирующим рецептором на NK-клетке.

[00642] Вариант осуществления 143 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ по любому из предыдущих вариантов осуществления, включающие экзогенную нуклеиновую кислоту или приведение клетки в контакт с экзогенной нуклеиновой кислотой, где экзогенная нуклеиновая кислота кодирует молекулу ингибитора NK-клеток, где молекула ингибитора NK-клеток связывается с NKG2A на NK-клетке.

[00643] Вариант осуществления 144 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ по любому из предыдущих вариантов осуществления, включающие экзогенную нуклеиновую кислоту

или приведение клетки в контакт с экзогенной нуклеиновой кислотой, где экзогенная нуклеиновая кислота кодирует молекулу ингибитора NK-клеток, где молекула ингибитора NK-клеток представляет собой неклассическую молекулу MHC класса I.

[00644] Вариант осуществления 145 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, включающие экзогенную нуклеиновую кислоту или приведение клетки в контакт с экзогенной нуклеиновой кислотой, где экзогенная нуклеиновая кислота кодирует молекулу ингибитора NK-клеток, где молекула ингибитора NK-клеток представляет собой HLA-E.

[00645] Вариант осуществления 146 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ по любому из предыдущих вариантов осуществления, включающие экзогенную нуклеиновую кислоту или приведение клетки в контакт с экзогенной нуклеиновой кислотой, где экзогенная нуклеиновая кислота кодирует молекулу ингибитора NK-клеток, где молекула ингибитора NK-клеток представляет собой слитый белок.

[00646] Вариант осуществления 147 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ по любому из предыдущих вариантов осуществления, включающие экзогенную нуклеиновую кислоту или приведение клетки в контакт с экзогенной нуклеиновой кислотой, где экзогенная нуклеиновая кислота кодирует молекулу ингибитора NK-клеток, где молекула ингибитора NK-клеток представляет собой слитый белок, содержащий HLA-E и B2M.

[00647] Вариант осуществления 148 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ по любому из предыдущих вариантов осуществления, включающие экзогенную нуклеиновую кислоту, кодирующую полипептид, который секретируется клеткой, или приведение клетки в контакт с указанной экзогенной нуклеиновой кислотой, где секретируемый полипептид представляет собой антитело или фрагмент антитела.

[00648] Вариант осуществления 149 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, включающие экзогенную нуклеиновую кислоту, кодирующую полипептид, который секретируется клеткой, или приведение клетки в контакт с указанной экзогенной нуклеиновой кислотой, где секретируемый полипептид представляет собой полноразмерное антитело IgG.

[00649] Вариант осуществления 150 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, включающие экзогенную нуклеиновую кислоту, кодирующую полипептид, который секретируется клеткой, или приведение клетки в контакт с указанной экзогенной нуклеиновой кислотой, где секретируемый полипептид представляет собой одноцепочечное антитело.

[00650] Вариант осуществления 151 представляет собой сконструированную

клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ по любому из предыдущих вариантов осуществления, включающие экзогенную нуклеиновую кислоту, кодирующую полипептид, который секретируется клеткой, или приведение клетки в контакт с указанной экзогенной нуклеиновой кислотой, где секретируемый полипептид представляет собой нейтрализующее антитело.

[00651] Вариант осуществления 152 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ по любому из предыдущих вариантов осуществления, включающие экзогенную нуклеиновую кислоту, кодирующую полипептид, который секретируется клеткой, или приведение клетки в контакт с указанной экзогенной нуклеиновой кислотой, где секретируемый полипептид представляет собой терапевтический полипептид.

[00652] Вариант осуществления 153 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, включающие экзогенную нуклеиновую кислоту, кодирующую полипептид, который секретируется клеткой, или приведение клетки в контакт с указанной экзогенной нуклеиновой кислотой, где секретируемый полипептид представляет собой фермент.

[00653] Вариант осуществления 154 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ по любому из предыдущих вариантов осуществления, включающие экзогенную нуклеиновую кислоту, кодирующую полипептид, который секретируется клеткой, или приведение клетки в контакт с указанной экзогенной нуклеиновой кислотой, где секретируемый полипептид представляет собой цитокин.

[00654] Вариант осуществления 155 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ по любому из предыдущих вариантов осуществления, включающие экзогенную нуклеиновую кислоту, кодирующую Хемокин который секретируется клеткой, или приведение клетки в контакт с указанной экзогенной нуклеиновой кислотой, где секретируемый полипептид представляет собой хемокин.

[00655] Вариант осуществления 156 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ по любому из предыдущих вариантов осуществления, включающие экзогенную нуклеиновую кислоту, кодирующую Слитые белки который секретируется клеткой, или приведение клетки в контакт с указанной экзогенной нуклеиновой кислотой, где секретируемый полипептид представляет собой слитый белок.

[00656] Вариант осуществления 157 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, композицию, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, включающие экзогенную нуклеиновую кислоту, кодирующую нацеливающий рецептор, или приведение клетки в контакт с экзогенной нуклеиновой кислотой, кодирующей

нацеливающий рецептор, где нацеливающий рецептор представляет собой Т-клеточный рецептор (ТКР).

[00657] Вариант осуществления 158 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, композицию, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, включающие экзогенную нуклеиновую кислоту, кодирующую нацеливающий рецептор, или приведение клетки в контакт с экзогенной нуклеиновой кислотой, кодирующей нацеливающий рецептор, где нацеливающий рецептор представляет собой генетически модифицированный ТКР.

[00658] Вариант осуществления 159 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, композицию, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, включающие экзогенную нуклеиновую кислоту, кодирующую нацеливающий рецептор, или приведение клетки в контакт с экзогенной нуклеиновой кислотой, кодирующей нацеливающий рецептор, где нацеливающий рецептор представляет собой ТКР WT1.

[00659] Вариант осуществления 160 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, композицию, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, включающие экзогенную нуклеиновую кислоту, кодирующую нацеливающий рецептор, или приведение клетки в контакт с экзогенной нуклеиновой кислотой, кодирующей нацеливающий рецептор, где нацеливающий рецептор представляет собой CAR.

[00660] Вариант осуществления 161 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, где CIITA-направленная РНК вводится в клетку в векторе.

[00661] Вариант осуществления 162 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, где РНК-направляемый ДНК-связывающий агент для CIITA вводится в клетку в векторе, необязательно в том же векторе, что и CIITA-направленная РНК.

[00662] Вариант осуществления 163 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, где экзогенная нуклеиновая кислота вводится в клетку в векторе.

[00663] Вариант осуществления 164 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ по варианту осуществления 163, где вектор представляет собой вирусный вектор.

[00664] Вариант осуществления 165 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ по варианту осуществления 163, где вектор представляет собой невирусный вектор.

[00665] Вариант осуществления 166 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ по варианту осуществления 164, где вектор представляет собой лентивирусный вектор.

[00666] Вариант осуществления 167 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ по варианту осуществления 164, где вектор представляет собой AAV.

[00667] Вариант осуществления 168 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, где направляющую РНК вводят в клетку в составной композиции липида и нуклеиновой кислоты, необязательно в той же составной композиции липида и нуклеиновой кислоты, что и РНК-направляемый ДНК-связывающий агент.

[00668] Вариант осуществления 169 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, где экзогенная нуклеиновая кислота вводится в клетку в составной композиции липида и нуклеиновой кислоты.

[00669] Вариант осуществления 170 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ по варианту осуществления 168 или 169, где составная композиция липида и нуклеиновой кислоты представляет собой липидную наночастицу (ЛНЧ).

[00670] Вариант осуществления 171 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, где экзогенная нуклеиновая кислота интегрирована в геном клетки.

[00671] Вариант осуществления 172 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, где экзогенная нуклеиновая кислота интегрируется в геном клетки путем гомологичной рекомбинации (ГР).

[00672] Вариант осуществления 173 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, где экзогенная нуклеиновая интегрирована в безопасный локус в геноме клетки.

[00673] Вариант осуществления 174 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, композицию, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, где CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 1.

[00674] Вариант осуществления 175 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, композицию, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, где CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 2.

[00675] Вариант осуществления 176 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, композицию, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, где CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 3.

[00676] Вариант осуществления 177 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, композицию, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, где CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 4.

[00677] Вариант осуществления 178 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, композицию, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, где CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 5.

[00678] Вариант осуществления 179 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, композицию, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, где CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 6.

[00679] Вариант осуществления 180 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, композицию, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, где CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 7.

[00680] Вариант осуществления 181 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, композицию, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, где CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 8.

[00681] Вариант осуществления 182 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, композицию, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, где CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 9.

[00682] Вариант осуществления 183 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, композицию, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, где CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 10.

[00683] Вариант осуществления 184 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, композицию, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, где CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 11.

[00684] Вариант осуществления 185 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, композицию, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, где CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 12.

[00685] Вариант осуществления 186 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, композицию, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, где CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 13.

[00686] Вариант осуществления 187 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, композицию, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, где CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 14.

[00687] Вариант осуществления 188 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, композицию, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, где CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 15.

[00688] Вариант осуществления 189 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, композицию, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, где CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 16.

[00689] Вариант осуществления 190 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, композицию, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, где CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 17.

[00690] Вариант осуществления 191 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, композицию, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, где CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 18.

[00691] Вариант осуществления 192 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, композицию, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, где CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 19.

[00692] Вариант осуществления 193 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, композицию, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, где CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 20.

[00693] Вариант осуществления 194 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, композицию, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, где CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 21.

[00694] Вариант осуществления 195 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, композицию, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, где CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 22.

[00695] Вариант осуществления 196 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, композицию, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, где CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 23.

[00696] Вариант осуществления 197 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, композицию, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, где CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 24.

[00697] Вариант осуществления 198 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, композицию, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, где CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 25.

[00698] Вариант осуществления 199 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, композицию, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, где CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 26.

[00699] Вариант осуществления 200 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, композицию, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, где CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 27.

[00700] Вариант осуществления 201 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, композицию, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, где CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 28.

[00701] Вариант осуществления 202 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, композицию, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, где CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 29.

[00702] Вариант осуществления 203 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, композицию, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, где CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 30.

[00703] Вариант осуществления 204 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, композицию, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, где CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 31.

[00704] Вариант осуществления 205 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, композицию, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, где CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 32.

[00705] Вариант осуществления 206 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, композицию, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, где CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 33.

[00706] Вариант осуществления 207 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, композицию, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, где CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 34.

[00707] Вариант осуществления 208 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, композицию, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, где CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 35.

[00708] Вариант осуществления 209 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, композицию, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, где CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 36.

[00709] Вариант осуществления 210 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, композицию, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, где CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 37.

[00710] Вариант осуществления 211 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, композицию, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, где CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 38.

[00711] Вариант осуществления 212 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, композицию, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, где CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 39.

[00712] Вариант осуществления 213 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, композицию, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, где CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 40.

[00713] Вариант осуществления 214 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, композицию, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, где CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 41.

[00714] Вариант осуществления 215 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, композицию, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, где CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 42.

[00715] Вариант осуществления 216 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, композицию, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, где CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 43.

[00716] Вариант осуществления 217 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, композицию, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, где CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 44.

[00717] Вариант осуществления 218 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, композицию, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, где CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 45.

[00718] Вариант осуществления 219 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, композицию, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, где CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 46.

[00719] Вариант осуществления 220 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, композицию, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, где CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 47.

[00720] Вариант осуществления 221 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, композицию, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, где CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 48.

[00721] Вариант осуществления 222 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, композицию, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, где CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 49.

[00722] Вариант осуществления 223 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, композицию, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, где CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 50.

[00723] Вариант осуществления 224 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, композицию, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, где CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 51.

[00724] Вариант осуществления 225 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, композицию, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, где CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 52.

[00725] Вариант осуществления 226 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, композицию, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, где CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 53.

[00726] Вариант осуществления 227 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, композицию, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, где CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 54.

[00727] Вариант осуществления 228 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, композицию, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, где CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 55.

[00728] Вариант осуществления 229 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, композицию, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, где CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 56.

[00729] Вариант осуществления 230 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, композицию, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, где CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 57.

[00730] Вариант осуществления 231 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, композицию, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, где CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 58.

[00731] Вариант осуществления 232 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, композицию, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, где CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 59.

[00732] Вариант осуществления 233 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, композицию, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, где CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 60.

[00733] Вариант осуществления 234 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, композицию, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, где CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 61.

[00734] Вариант осуществления 235 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, композицию, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, где CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 62.

[00735] Вариант осуществления 236 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, композицию, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, где CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 63.

[00736] Вариант осуществления 237 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, композицию, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, где CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 64.

[00737] Вариант осуществления 238 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, композицию, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, где CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 65.

[00738] Вариант осуществления 239 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, композицию, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, где CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 66.

[00739] Вариант осуществления 240 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, композицию, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, где CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 67.

[00740] Вариант осуществления 241 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, композицию, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, где CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 68.

[00741] Вариант осуществления 242 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, композицию, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, где CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 69.

[00742] Вариант осуществления 243 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, композицию, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, где CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 70.

[00743] Вариант осуществления 244 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, композицию, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, где CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 71.

[00744] Вариант осуществления 245 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, композицию, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, где CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 72.

[00745] Вариант осуществления 246 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, композицию, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, где CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 73.

[00746] Вариант осуществления 247 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, композицию, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, где CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 74.

[00747] Вариант осуществления 248 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, композицию, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, где CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 75.

[00748] Вариант осуществления 249 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, композицию, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, где CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 76.

[00749] Вариант осуществления 250 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, композицию, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, где CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 77.

[00750] Вариант осуществления 251 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, композицию, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, где CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 78.

[00751] Вариант осуществления 252 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, композицию, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, где CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 79.

[00752] Вариант осуществления 253 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, композицию, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, где CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 80.

[00753] Вариант осуществления 254 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, композицию, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, где CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 81.

[00754] Вариант осуществления 255 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, композицию, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, где CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 82.

[00755] Вариант осуществления 256 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, композицию, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, где CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 83.

[00756] Вариант осуществления 257 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, композицию, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, где CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 84.

[00757] Вариант осуществления 258 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, композицию, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, где CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 85.

[00758] Вариант осуществления 259 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, композицию, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, где CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 86.

[00759] Вариант осуществления 260 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, композицию, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, где CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 87.

[00760] Вариант осуществления 261 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, композицию, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, где CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 88.

[00761] Вариант осуществления 262 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, композицию, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, где CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 89.

[00762] Вариант осуществления 263 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, композицию, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, где CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 90.

[00763] Вариант осуществления 264 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, композицию, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, где CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 91.

[00764] Вариант осуществления 265 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, композицию, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, где CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 92.

[00765] Вариант осуществления 266 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, композицию, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, где CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 93.

[00766] Вариант осуществления 267 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, композицию, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, где CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 94.

[00767] Вариант осуществления 268 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, композицию, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, где CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 95.

[00768] Вариант осуществления 269 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, композицию, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, где CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 96.

[00769] Вариант осуществления 270 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, композицию, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, где CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 97.

[00770] Вариант осуществления 271 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, композицию, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, где CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 98.

[00771] Вариант осуществления 272 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, композицию, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, где CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 99.

[00772] Вариант осуществления 273 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, композицию, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, где CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 100.

[00773] Вариант осуществления 274 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, композицию, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, где CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 101.

[00774] Вариант осуществления 275 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, композицию, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, где CIITA-направленная РНК содержит по меньшей мере одну модификацию.

[00775] Вариант осуществления 276 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, композицию, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, где CIITA-направленная РНК содержит по меньшей мере одну модификацию, включающую 2'-О-метил (2'-О-Me) модифицированный нуклеотид.

[00776] Вариант осуществления 277 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, композицию, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, где CIITA-направленная РНК содержит по меньшей мере одну модификацию, включающую фосфоротиоатную (ФТ) связь между нуклеотидами.

[00777] Вариант осуществления 278 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, композицию, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, где CIITA-направленная РНК содержит по меньшей мере одну модификацию, содержащую 2'-фтор (2'-F) модифицированный нуклеотид.

[00778] Вариант осуществления 279 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, композицию, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, где CIITA-направленная РНК содержит по меньшей мере одну модификацию, включающую модификацию одного или нескольких из первых пяти нуклеотидов на 5'-конце направляющей РНК.

[00779] Вариант осуществления 280 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, композицию, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, где CIITA-направленная РНК содержит по меньшей мере одну модификацию, включающую модификацию одного или нескольких из последних пяти нуклеотидов на 3'-конце направляющей РНК.

[00780] Вариант осуществления 281 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, композицию, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, где CIITA-направленная РНК содержит по меньшей мере одну модификацию, содержащую ФТ-связь между первыми четырьмя нуклеотидами направляющей РНК.

[00781] Вариант осуществления 282 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, композицию, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, где CIITA-направленная РНК содержит по меньшей мере одну модификацию, содержащую ФТ-связь между последними четырьмя нуклеотидами направляющей РНК.

[00782] Вариант осуществления 283 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, композицию, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, где CIITA-направленная РНК содержит по меньшей мере одну модификацию, включающую 2'-О-Me модифицированный нуклеотид в первых трех нуклеотидах на 5'-конце направляющей

РНК.

[00783] Вариант осуществления 284 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, композицию, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, где CIITA-направленная РНК содержит по меньшей мере одну модификацию, включающую 2'-O-Me модифицированный нуклеотид в последних трех нуклеотидах на 3'-конце направляющей РНК.

[00784] Вариант осуществления 285 представляет собой сконструированную клетку или популяцию клеток, содержащую генетическую модификацию, которая включает индел в геномной области, на которую нацелена CIITA-направленная РНК по любому из предыдущих вариантов осуществления.

[00785] Вариант осуществления 286 представляет собой сконструированную клетку или популяцию клеток, содержащую генетическую модификацию, которая включает замену C на T или замену A на G в геномной области, на которую нацелена CIITA-направленная РНК по любому из предыдущих вариантов осуществления.

[00786] Вариант осуществления 287 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, композицию, фармацевтическую композицию или способ по любому из предыдущих вариантов осуществления для применения для экспрессии ТКР со специфичностью к полипептиду, экспрессируемому раковыми клетками.

[00787] Вариант осуществления 288 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, композицию, фармацевтическую композицию или способ по любому из предыдущих вариантов осуществления для применения при введении субъекту в качестве терапии на основе адоптивного переноса клеток (АПК).

[00788] Вариант осуществления 289 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, композицию, фармацевтическую композицию или способ по любому из предыдущих вариантов осуществления для применения при лечении субъекта, больного раком.

[00789] Вариант осуществления 290 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, композицию, фармацевтическую композицию или способ по любому из предыдущих вариантов осуществления для применения при лечении субъекта с инфекционным заболеванием.

[00790] Вариант осуществления 291 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, композицию, фармацевтическую композицию или способ по любому из предыдущих вариантов осуществления для применения при лечении субъекта с аутоиммунным заболеванием.

[00791] Вариант осуществления 292 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ по любому из предыдущих вариантов осуществления, где генетическая модификация включает индел.

[00792] Вариант осуществления 293 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ по любому из

предыдущих вариантов осуществления, где генетическая модификация включает замену C на T.

[00793] Вариант осуществления 294 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ по любому из предыдущих вариантов осуществления, где генетическая модификация включает замену от A до G.

[00794] Вариант осуществления 295 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ по любому из предыдущих вариантов осуществления, где клетка является гомозиготной по HLA-B и гомозиготной по HLA-C.

[00795] Вариант осуществления 296 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, где клетка дополнительно содержит генетическую модификацию в гене HLA-A, где клетка является гомозиготной по HLA-B и гомозиготной по HLA-C, и где генетическая модификация в гене HLA-A включает по меньшей мере один нуклеотид в пределах геномных координат, выбранных из: a) от chr6:29942854 до chr6:29942913 и b) от chr6:29943518 до chr6:29943619.

[00796] Вариант осуществления 297 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, где клетка дополнительно содержит генетическую модификацию в гене HLA-A, и где генетическая модификация в гене HLA-A содержит по меньшей мере один нуклеотид в пределах геномных координат, выбранных из: от chr6:29942864 до chr6: 29942903.

[00797] Вариант осуществления 298 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, где клетка дополнительно содержит генетическую модификацию в гене HLA-A, и где генетическая модификация в гене HLA-A включает по меньшей мере один нуклеотид в пределах геномных координат, выбранных из: от chr6:29943528 до chr6:29943609.

[00798] Вариант осуществления 299 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, где клетка дополнительно содержит генетическую модификацию в гене HLA-A, и где генетическая модификация в гене HLA-A содержит по меньшей мере один нуклеотид в пределах геномных координат, выбранных из: chr6:29942864-29942884; chr6:29942868-29942888; chr6:29942876-29942896; chr6:29942877-29942897; chr6:29942883-29942903; chr6:29943126-29943146; chr6:29943528-29943548; chr6:29943529-29943549; chr6:29943530-29943550; chr6:29943537-29943557; chr6:29943549-29943569; chr6:29943589-29943609 и chr6:29944026-29944046.

[00799] Вариант осуществления 300 представляет собой сконструированную

клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, где клетка дополнительно содержит генетическую модификацию в гене HLA-A, и где генетическая модификация в гене HLA-A содержит индел, замену C на T или замену A на G в пределах геномных координат, выбранных из: chr6:29942864-29942884; chr6:29942868-29942888; chr6:29942876-29942896; chr6:29942877-29942897; chr6:29942883-29942903; chr6:29943126-29943146; chr6:29943528-29943548; chr6:29943529-29943549; chr6:29943530-29943550; chr6:29943537-29943557; chr6:29943549-29943569; chr6:29943589-29943609 и chr6:29944026-29944046.

[00800] Вариант осуществления 301 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, где экспрессия HLA-A в клетке снижена или устранена с помощью системы редактирования генов, которая связывается с геномной целевой последовательностью HLA-A, содержащей по меньшей мере 5 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат, выбранных из: chr6:29942864-29942884; chr6:29942868-29942888; chr6:29942876-29942896; chr6:29942877-29942897; chr6:29942883-29942903; chr6:29943126-29943146; chr6:29943528-29943548; chr6:29943529-29943549; chr6:29943530-29943550; chr6:29943537-29943557; chr6:29943549-29943569; chr6:29943589-29943609 и chr6:29944026-29944046.

[00801] Вариант осуществления 302 представляет собой способ получения сконструированной клетки, которая имеет сниженную или устраненную поверхностную экспрессию белка MHC класса II и белка HLA-A по сравнению с немодифицированной клеткой, включающий: a) приведение клетки в контакт с CIITA-направленной РНК, где направляющая РНК содержит направляющую последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1-101; b) приведение клетки в контакт с HLA-A-направленной РНК, где HLA-A-направленная РНК содержит направляющую последовательность, выбранную из любой из SEQ ID NO: 2001-2095; и c) необязательно приведение клетки в контакт с РНК-направляемым ДНК-связывающим агентом или нуклеиновой кислотой, кодирующей РНК-направляемый ДНК-связывающий агент; тем самым снижая или устраняя поверхностную экспрессию белка MHC класса II и белка HLA-A в клетке по сравнению с немодифицированной клеткой.

[00802] Вариант осуществления 303 представляет собой способ по непосредственно предшествующему варианту осуществления, включающий приведение клетки в контакт с РНК-направляемым ДНК-связывающим агентом или нуклеиновой кислотой, кодирующей РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, необязательно, где РНК-направляемый ДНК-связывающий агент содержит Cas9 S. pyogenes.

[00803] Вариант осуществления 304 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, где HLA-B выбран из любых из следующих аллелей HLA-B: HLA-B*07:02; HLA-B*08:01; HLA-B*44:02; HLA-B*35:01;

HLA-B*40:01; HLA-B*57:01; HLA-B*14:02; HLA-B*15:01; HLA-B*13:02; HLA-B*44:03; HLA-B*38:01; HLA-B*18:01; HLA-B*44:03; HLA-B*51:01; HLA-B*49:01; HLA-B*15:01; HLA-B*18:01; HLA-B*27:05; HLA-B*35:03; HLA-B*18:01; HLA-B*52:01; HLA-B*51:01; HLA-B*37:01; HLA-B*53:01; HLA-B*55:01; HLA-B*44:02; HLA-B*44:03; HLA-B*35:02; HLA-B*15:01; и HLA-B*40:02.

[00804] Вариант осуществления 305 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, где HLA-C выбран из любого из следующих аллелей HLA-C: HLA-C*07:02; HLA-C*07:01; HLA-C*05:01; HLA-C*04:01 HLA-C*03:04; HLA-C*06:02; HLA-C*08:02; HLA-C*03:03; HLA-C*06:02; HLA-C*16:01; HLA-C*12:03; HLA-C*07:01; HLA-C*04:01; HLA-C*15:02; HLA-C*07:01; HLA-C*03:04; HLA-C*12:03; HLA-C*02:02; HLA-C*04:01; HLA-C*05:01; HLA-C*12:02; HLA-C*14:02; HLA-C*06:02; HLA-C*04:01; HLA-C*03:03; HLA-C*07:04; HLA-C*07:01; HLA-C*04:01; HLA-C*04:01; и HLA-C*02:02.

[00805] Вариант осуществления 306 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, где аллель HLA-B выбран из любого из следующих аллелей HLA-B: HLA-B*07:02; HLA-B*08:01; HLA-B*44:02; HLA-B*35:01; HLA-B*40:01; HLA-B*57:01; HLA-B*14:02; HLA-B*15:01; HLA-B*13:02; HLA-B*44:03; HLA-B*38:01; HLA-B*18:01; HLA-B*44:03; HLA-B*51:01; HLA-B*49:01; HLA-B*15:01; HLA-B*18:01; HLA-B*27:05; HLA-B*35:03; HLA-B*18:01; HLA-B*52:01; HLA-B*51:01; HLA-B*37:01; HLA-B*53:01; HLA-B*55:01; HLA-B*44:02; HLA-B*44:03; HLA-B*35:02; HLA-B*15:01 и HLA-B*40:02; и аллель HLA-C выбран из любого из следующих аллелей HLA-C: HLA-C*07:02; HLA-C*07:01; HLA-C*05:01; HLA-C*04:01 HLA-C*03:04; HLA-C*06:02; HLA-C*08:02; HLA-C*03:03; HLA-C*06:02; HLA-C*16:01; HLA-C*12:03; HLA-C*07:01; HLA-C*04:01; HLA-C*15:02; HLA-C*07:01; HLA-C*03:04; HLA-C*12:03; HLA-C*02:02; HLA-C*04:01; HLA-C*05:01; HLA-C*12:02; HLA-C*14:02; HLA-C*06:02; HLA-C*04:01; HLA-C*03:03; HLA-C*07:04; HLA-C*07:01; HLA-C*04:01; HLA-C*04:01; и HLA-C*02:02.

[00806] Вариант осуществления 307 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, где аллели HLA-B и HLA-C выбраны из любого из следующих аллелей HLA-B и HLA-C: HLA-B*07:02 и HLA-C*07:02; HLA-B*08:01 и HLA-C*07:01; HLA-B*44:02 и HLA-C*05:01; HLA-B*35:01 и HLA-C*04:01; HLA-B*40:01 и HLA-C*03:04; HLA-B*57:01 и HLA-C*06:02; HLA-B*14:02 и HLA-C*08:02; HLA-B*15:01 и HLA-C*03:03; HLA-B*13:02 и HLA-C*06:02; HLA-B*44:03 и HLA-C*16:01; HLA-B*38:01 и HLA-C*12:03; HLA-B*18:01 и HLA-C*07:01; HLA-B*44:03 и HLA-C*04:01; HLA-B*51:01 и HLA-C*15:02; HLA-B*49:01 и HLA-C*07:01; HLA-B*15:01 и HLA-C*03:04; HLA-B*18:01 и HLA-C*12:03; HLA-B*27:05 и HLA-C*02:02; HLA-B*35:03 и HLA-C*04:01; HLA-B*18:01 и HLA-C*05:01; HLA-B*52:01 и HLA-

C*12:02; HLA-B*51:01 и HLA-C*14:02; HLA-B*37:01 и HLA-C*06:02; HLA-B*53:01 и HLA-C*04:01; HLA-B*55:01 и HLA-C*03:03; HLA-B*44:02 и HLA-C*07:04; HLA-B*44:03 и HLA-C*07:01; HLA-B*35:02 и HLA-C*04:01; HLA-B*15:01 и HLA-C*04:01; и HLA-B*40:02 и HLA-C*02:02.

[00807] Вариант осуществления 308 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, где аллели HLA-B и HLA-C представляют собой HLA-B*07:02 и HLA-C*07:02.

[00808] Вариант осуществления 309 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, где аллели HLA-B и HLA-C представляют собой HLA-B*08:01 и HLA-C*07:01.

[00809] Вариант осуществления 310 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, где аллели HLA-B и HLA-C представляют собой HLA-B*44:02 и HLA-C*05:01.

[00810] Вариант осуществления 311 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, где аллели HLA-B и HLA-C представляют собой HLA-B*35:01 и HLA-C*04:01.

[00811] **Таблица 23. ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ**

[00812] В следующей таблице и далее термины «mA», «mC», «mU» или «mG» используются для обозначения нуклеотида, модифицированного 2’-O-Me. В следующей таблице «*» используется для обозначения модификации PS. В данной заявке термины A*, C*, U* или G* могут использоваться для обозначения нуклеотида, который связан со следующим (например, 3’) нуклеотидом PS-связью. Понятно, что если последовательность ДНК (содержащая T) упоминается относительно РНК, то T следует заменить на U (которые могут быть модифицированы или немодифицированы в зависимости от контекста), и наоборот. В следующей таблице для обозначения пептидных последовательностей используется однобуквенный код аминокислоты.

	SEQ ID NO	**Последовательность**
нРНК G000529	701	mG*mG*mC*CACGGAGCGAGACAUCUGUUUUAGA mGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAA AUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmA mAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmU mCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
нРНК G013674	702	mU*mU*mC*UAGGGGCCCCAACUCCAGUUUUAGA mGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAA

		AUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmA mAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmU mCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
нPHK G012086	703	mA*mG*mA*GUCUCUCAGCUGGUACAGUUUUAGA mGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAA AUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmA mAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmU mCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
нPHK G015995	704	mU*mU*mA*CCCCACUUAACUAUCUUGUUUUAGA mGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAA AUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmA mAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmU mCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
нPHK G016017	705	mC*mC*mA*CUCUGCCCCAUGGGCUCGUUUUAGA mGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAA AUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmA mAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmU mCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
нPHK G016206	706	mC*mG*mC*UGUCAAGUCCAGUUCUAGUUUUAGA mGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAA AUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmA mAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmU mCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
нPHK G000644	707	mG*mA*mG*UCCGAGCAGAAGAAGAAGUUUUAGA mGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAA AUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmA mAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmU mCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
нPHK G000645	708	mG*mA*mC*CCCCUCCACCCCGCCUCGUUUUAGA mGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAA AUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmA mAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmU mCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
нPHK G000646	709	mG*mA*mC*UUGUUUUCAUUGUUCUCGUUUUAGA

		mGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAA AUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmA mAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmU mCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
Аминокислотная последовательность рекомбинантного Cas9-NLS	800	MDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLG NTDRHSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYT RRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFFHRLEESFLVEED KKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDST DKADLRLIYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVD KLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSKS RRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNF DLAEDAKLQLSKDTYDDDLDNLLAQIGDQYADLFL AAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEH HQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYID GGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRK QRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYPFLKDNRE KIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITP WNFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPK HSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQK KAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISG VEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDI VLTLTLFEDREMIEERLKTYAHLFDDKVMKQLKRRR YTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANR NFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANL AGSPAIKKGILQTVKVVDELVKVMGRHKPENIVIEM ARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQILKEHP VENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSD YDVDHIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVP SEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERG GLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTK YDENDKLIREVKVITLKSKLVSDFRKDFQFYKVREIN NYHHAHDAYLNAVVGTALIKKYPKLESEFVYGDYK VYDVRKMIAKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEIT LANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVL SMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKK

		DWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKVEKGKSKKLKS VKELLGITIMERSSFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIK LPKYSLFELENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYV NFLYLASHYEKLKGSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEI IEQISEFSKRVILADANLDKVLSAYNKHRDKPIREQA ENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVL DATLIHQSITGLYETRIDLSQLGGDGGGSPKKKRKV
ORF, кодирующая Sp. Cas9	801	ATGGACAAGAAGTACAGCATCGGACTGGACATCG GAACAAACAGCGTCGGATGGGCAGTCATCACAGA CGAATACAAGGTCCCGAGCAAGAAGTTCAAGGTC CTGGGAAACACAGACAGACACAGCATCAAGAAGA ACCTGATCGGAGCACTGCTGTTCGACAGCGGAGA AACAGCAGAAGCAACAAGACTGAAGAGAACAGC AAGAAGAAGATACACAAGAAGAAAGAACAGAAT CTGCTACCTGCAGGAAATCTTCAGCAACGAAATG GCAAAGGTCGACGACAGCTTCTTCCACAGACTGG AAGAAAGCTTCCTGGTCGAAGAAGACAAGAAGCA CGAAAGACACCCGATCTTCGGAAACATCGTCGAC GAAGTCGCATACCACGAAAAGTACCCGACAATCT ACCACCTGAGAAAGAAGCTGGTCGACAGCACAGA CAAGGCAGACCTGAGACTGATCTACCTGGCACTG GCACACATGATCAAGTTCAGAGGACACTTCCTGAT CGAAGGAGACCTGAACCCGGACAACAGCGACGTC GACAAGCTGTTCATCCAGCTGGTCCAGACATACA ACCAGCTGTTCGAAGAAAACCCGATCAACGCAAG CGGAGTCGACGCAAAGGCAATCCTGAGCGCAAGA CTGAGCAAGAGCAGAAGACTGGAAAACCTGATCG CACAGCTGCCGGGAGAAAAGAAGAACGGACTGTT CGGAAACCTGATCGCACTGAGCCTGGGACTGACA CCGAACTTCAAGAGCAACTTCGACCTGGCAGAAG ACGCAAAGCTGCAGCTGAGCAAGGACACATACGA CGACGACCTGGACAACCTGCTGGCACAGATCGGA GACCAGTACGCAGACCTGTTCCTGGCAGCAAAGA ACCTGAGCGACGCAATCCTGCTGAGCGACATCCT GAGAGTCAACACAGAAATCACAAAGGCACCGCTG

		AGCGCAAGCATGATCAAGAGATACGACGAACACC ACCAGGACCTGACACTGCTGAAGGCACTGGTCAG ACAGCAGCTGCCGGAAAAGTACAAGGAAATCTTC TTCGACCAGAGCAAGAACGGATACGCAGGATACA TCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAATTCTACAA GTTCATCAAGCCGATCCTGGAAAAGATGGACGGA ACAGAAGAACTGCTGGTCAAGCTGAACAGAGAAG ACCTGCTGAGAAAGCAGAGAACATTCGACAACGG AAGCATCCCGCACCAGATCCACCTGGGAGAACTG CACGCAATCCTGAGAAGACAGGAAGACTTCTACC CGTTCCTGAAGGACAACAGAGAAAAGATCGAAAA GATCCTGACATTCAGAATCCCGTACTACGTCGGAC CGCTGGCAAGAGGAAACAGCAGATTCGCATGGAT GACAAGAAAGAGCGAAGAAACAATCACACCGTG GAACTTCGAAGAAGTCGTCGACAAGGGAGCAAGC GCACAGAGCTTCATCGAAAGAATGACAAACTTCG ACAAGAACCTGCCGAACGAAAAGGTCCTGCCGAA GCACAGCCTGCTGTACGAATACTTCACAGTCTACA ACGAACTGACAAAGGTCAAGTACGTCACAGAAGG AATGAGAAAGCCGGCATTCCTGAGCGGAGAACAG AAGAAGGCAATCGTCGACCTGCTGTTCAAGACAA ACAGAAAGGTCACAGTCAAGCAGCTGAAGGAAGA CTACTTCAAGAAGATCGAATGCTTCGACAGCGTCG AAATCAGCGGAGTCGAAGACAGATTCAACGCAAG CCTGGGAACATACCACGACCTGCTGAAGATCATC AAGGACAAGGACTTCCTGGACAACGAAGAAAACG AAGACATCCTGGAAGACATCGTCCTGACACTGAC ACTGTTCGAAGACAGAGAAATGATCGAAGAAAGA CTGAAGACATACGCACACCTGTTCGACGACAAGG TCATGAAGCAGCTGAAGAGAAGAAGATACACAGG ATGGGGAAGACTGAGCAGAAAGCTGATCAACGGA ATCAGAGACAAGCAGAGCGGAAAGACAATCCTGG ACTTCCTGAAGAGCGACGGATTCGCAAACAGAAA CTTCATGCAGCTGATCCACGACGACAGCCTGACAT TCAAGGAAGACATCCAGAAGGCACAGGTCAGCGG

		ACAGGGAGACAGCCTGCACGAACACATCGCAAAC CTGGCAGGAAGCCCGGCAATCAAGAAGGGAATCC TGCAGACAGTCAAGGTCGTCGACGAACTGGTCAA GGTCATGGGAAGACACAAGCCGGAAAACATCGTC ATCGAAATGGCAAGAGAAAACCAGACAACACAG AAGGGACAGAAGAACAGCAGAGAAAGAATGAAG AGAATCGAAGAAGGAATCAAGGAACTGGGAAGC CAGATCCTGAAGGAACACCCGGTCGAAAACACAC AGCTGCAGAACGAAAAGCTGTACCTGTACTACCT GCAGAACGGAAGAGACATGTACGTCGACCAGGAA CTGGACATCAACAGACTGAGCGACTACGACGTCG ACCACATCGTCCCGCAGAGCTTCCTGAAGGACGA CAGCATCGACAACAAGGTCCTGACAAGAAGCGAC AAGAACAGAGGAAAGAGCGACAACGTCCCGAGC GAAGAAGTCGTCAAGAAGATGAAGAACTACTGGA GACAGCTGCTGAACGCAAAGCTGATCACACAGAG AAAGTTCGACAACCTGACAAAGGCAGAGAGAGGA GGACTGAGCGAACTGGACAAGGCAGGATTCATCA AGAGACAGCTGGTCGAAACAAGACAGATCACAAA GCACGTCGCACAGATCCTGGACAGCAGAATGAAC ACAAAGTACGACGAAAACGACAAGCTGATCAGAG AAGTCAAGGTCATCACACTGAAGAGCAAGCTGGT CAGCGACTTCAGAAAGGACTTCCAGTTCTACAAG GTCAGAGAAATCAACAACTACCACCACGCACACG ACGCATACCTGAACGCAGTCGTCGGAACAGCACT GATCAAGAAGTACCCGAAGCTGGAAAGCGAATTC GTCTACGGAGACTACAAGGTCTACGACGTCAGAA AGATGATCGCAAAGAGCGAACAGGAAATCGGAA AGGCAACAGCAAAGTACTTCTTCTACAGCAACAT CATGAACTTCTTCAAGACAGAAATCACACTGGCA AACGGAGAAATCAGAAAGAGACCGCTGATCGAAA CAAACGGAGAAACAGGAGAAATCGTCTGGGACAA GGGAAGAGACTTCGCAACAGTCAGAAAGGTCCTG AGCATGCCGCAGGTCAACATCGTCAAGAAGACAG AAGTCCAGACAGGAGGATTCAGCAAGGAAAGCAT

		CCTGCCGAAGAGAAACAGCGACAAGCTGATCGCA AGAAAGAAGGACTGGGACCCGAAGAAGTACGGA GGATTCGACAGCCCGACAGTCGCATACAGCGTCC TGGTCGTCGCAAAGGTCGAAAAGGGAAAGAGCAA GAAGCTGAAGAGCGTCAAGGAACTGCTGGGAATC ACAATCATGGAAAGAAGCAGCTTCGAAAAGAACC CGATCGACTTCCTGGAAGCAAAGGGATACAAGGA AGTCAAGAAGGACCTGATCATCAAGCTGCCGAAG TACAGCCTGTTCGAACTGGAAAACGGAAGAAAGA GAATGCTGGCAAGCGCAGGAGAACTGCAGAAGGG AAACGAACTGGCACTGCCGAGCAAGTACGTCAAC TTCCTGTACCTGGCAAGCCACTACGAAAAGCTGA AGGGAAGCCCGGAAGACAACGAACAGAAGCAGC TGTTCGTCGAACAGCACAAGCACTACCTGGACGA AATCATCGAACAGATCAGCGAATTCAGCAAGAGA GTCATCCTGGCAGACGCAAACCTGGACAAGGTCC TGAGCGCATACAACAAGCACAGAGACAAGCCGAT CAGAGAACAGGCAGAAAACATCATCCACCTGTTC ACACTGACAAACCTGGGAGCACCGGCAGCATTCA AGTACTTCGACACAACAATCGACAGAAAGAGATA CACAAGCACAAAGGAAGTCCTGGACGCAACACTG ATCCACCAGAGCATCACAGGACTGTACGAAACAA GAATCGACCTGAGCCAGCTGGGAGGAGACGGAGG AGGAAGCCCGAAGAAGAAGAGAAAGGTCTAG
ORF, кодирующая Sp. Cas9	802	ATGGACAAGAAGTACTCCATCGGCCTGGACATCG GCACCAACTCCGTGGGCTGGGCCGTGATCACCGA CGAGTACAAGGTGCCCTCCAAGAAGTTCAAGGTG CTGGGCAACACCGACCGGCACTCCATCAAGAAGA ACCTGATCGGCGCCCTGCTGTTCGACTCCGGCGAG ACCGCCGAGGCCACCCGGCTGAAGCGGACCGCCC GGCGGCGGTACACCCGGCGGAAGAACCGGATCTG CTACCTGCAGGAGATCTTCTCCAACGAGATGGCCA AGGTGGACGACTCCTTCTTCCACCGGCTGGAGGA GTCCTTCCTGGTGGAGGAGGACAAGAAGCACGAG CGGCACCCCATCTTCGGCAACATCGTGGACGAGG

		TGGCCTACCACGAGAAGTACCCCACCATCTACCAC CTGCGGAAGAAGCTGGTGGACTCCACCGACAAGG CCGACCTGCGGCTGATCTACCTGGCCCTGGCCCAC ATGATCAAGTTCCGGGGCCACTTCCTGATCGAGGG CGACCTGAACCCCGACAACTCCGACGTGGACAAG CTGTTCATCCAGCTGGTGCAGACCTACAACCAGCT GTTCGAGGAGAACCCCATCAACGCCTCCGGCGTG GACGCCAAGGCCATCCTGTCCGCCCGGCTGTCCAA GTCCCGGCGGCTGGAGAACCTGATCGCCCAGCTG CCCGGCGAGAAGAAGAACGGCCTGTTCGGCAACC TGATCGCCCTGTCCCTGGGCCTGACCCCCAACTTC AAGTCCAACTTCGACCTGGCCGAGGACGCCAAGC TGCAGCTGTCCAAGGACACCTACGACGACGACCT GGACAACCTGCTGGCCCAGATCGGCGACCAGTAC GCCGACCTGTTCCTGGCCGCCAAGAACCTGTCCGA CGCCATCCTGCTGTCCGACATCCTGCGGGTGAACA CCGAGATCACCAAGGCCCCCCTGTCCGCCTCCATG ATCAAGCGGTACGACGAGCACCACCAGGACCTGA CCCTGCTGAAGGCCCTGGTGCGGCAGCAGCTGCC CGAGAAGTACAAGGAGATCTTCTTCGACCAGTCC AAGAACGGCTACGCCGGCTACATCGACGGCGGCG CCTCCCAGGAGGAGTTCTACAAGTTCATCAAGCCC ATCCTGGAGAAGATGGACGGCACCGAGGAGCTGC TGGTGAAGCTGAACCGGGAGGACCTGCTGCGGAA GCAGCGGACCTTCGACAACGGCTCCATCCCCCACC AGATCCACCTGGGCGAGCTGCACGCCATCCTGCG GCGGCAGGAGGACTTCTACCCCTTCCTGAAGGAC AACCGGGAGAAGATCGAGAAGATCCTGACCTTCC GGATCCCCTACTACGTGGGCCCCCTGGCCCGGGGC AACTCCCGGTTCGCCTGGATGACCCGGAAGTCCG AGGAGACCATCACCCCCTGGAACTTCGAGGAGGT GGTGGACAAGGGCGCCTCCGCCCAGTCCTTCATCG AGCGGATGACCAACTTCGACAAGAACCTGCCCAA CGAGAAGGTGCTGCCCAAGCACTCCCTGCTGTAC GAGTACTTCACCGTGTACAACGAGCTGACCAAGG

		TGAAGTACGTGACCGAGGGCATGCGGAAGCCCGC CTTCCTGTCCGGCGAGCAGAAGAAGGCCATCGTG GACCTGCTGTTCAAGACCAACCGGAAGGTGACCG TGAAGCAGCTGAAGGAGGACTACTTCAAGAAGAT CGAGTGCTTCGACTCCGTGGAGATCTCCGGCGTGG AGGACCGGTTCAACGCCTCCCTGGGCACCTACCAC GACCTGCTGAAGATCATCAAGGACAAGGACTTCC TGGACAACGAGGAGAACGAGGACATCCTGGAGGA CATCGTGCTGACCCTGACCCTGTTCGAGGACCGGG AGATGATCGAGGAGCGGCTGAAGACCTACGCCCA CCTGTTCGACGACAAGGTGATGAAGCAGCTGAAG CGGCGGCGGTACACCGGCTGGGGCCGGCTGTCCC GGAAGCTGATCAACGGCATCCGGGACAAGCAGTC CGGCAAGACCATCCTGGACTTCCTGAAGTCCGAC GGCTTCGCCAACCGGAACTTCATGCAGCTGATCCA CGACGACTCCCTGACCTTCAAGGAGGACATCCAG AAGGCCCAGGTGTCCGGCCAGGGCGACTCCCTGC ACGAGCACATCGCCAACCTGGCCGGCTCCCCCGC CATCAAGAAGGGCATCCTGCAGACCGTGAAGGTG GTGGACGAGCTGGTGAAGGTGATGGGCCGGCACA AGCCCGAGAACATCGTGATCGAGATGGCCCGGGA GAACCAGACCACCCAGAAGGGCCAGAAGAACTCC CGGGAGCGGATGAAGCGGATCGAGGAGGGCATCA AGGAGCTGGGCTCCCAGATCCTGAAGGAGCACCC CGTGGAGAACACCCAGCTGCAGAACGAGAAGCTG TACCTGTACTACCTGCAGAACGGCCGGGACATGT ACGTGGACCAGGAGCTGGACATCAACCGGCTGTC CGACTACGACGTGGACCACATCGTGCCCCAGTCCT TCCTGAAGGACGACTCCATCGACAACAAGGTGCT GACCCGGTCCGACAAGAACCGGGGCAAGTCCGAC AACGTGCCCTCCGAGGAGGTGGTGAAGAAGATGA AGAACTACTGGCGGCAGCTGCTGAACGCCAAGCT GATCACCCAGCGGAAGTTCGACAACCTGACCAAG GCCGAGCGGGGCGGCCTGTCCGAGCTGGACAAGG CCGGCTTCATCAAGCGGCAGCTGGTGGAGACCCG

		GCAGATCACCAAGCACGTGGCCCAGATCCTGGAC TCCCGGATGAACACCAAGTACGACGAGAACGACA AGCTGATCCGGGAGGTGAAGGTGATCACCCTGAA GTCCAAGCTGGTGTCCGACTTCCGGAAGGACTTCC AGTTCTACAAGGTGCGGGAGATCAACAACTACCA CCACGCCCACGACGCCTACCTGAACGCCGTGGTG GGCACCGCCCTGATCAAGAAGTACCCCAAGCTGG AGTCCGAGTTCGTGTACGGCGACTACAAGGTGTA CGACGTGCGGAAGATGATCGCCAAGTCCGAGCAG GAGATCGGCAAGGCCACCGCCAAGTACTTCTTCTA CTCCAACATCATGAACTTCTTCAAGACCGAGATCA CCCTGGCCAACGGCGAGATCCGGAAGCGGCCCCT GATCGAGACCAACGGCGAGACCGGCGAGATCGTG TGGGACAAGGGCCGGGACTTCGCCACCGTGCGGA AGGTGCTGTCCATGCCCCAGGTGAACATCGTGAA GAAGACCGAGGTGCAGACCGGCGGCTTCTCCAAG GAGTCCATCCTGCCCAAGCGGAACTCCGACAAGC TGATCGCCCGGAAGAAGGACTGGGACCCCAAGAA GTACGGCGGCTTCGACTCCCCCACCGTGGCCTACT CCGTGCTGGTGGTGGCCAAGGTGGAGAAGGGCAA GTCCAAGAAGCTGAAGTCCGTGAAGGAGCTGCTG GGCATCACCATCATGGAGCGGTCCTCCTTCGAGAA GAACCCCATCGACTTCCTGGAGGCCAAGGGCTAC AAGGAGGTGAAGAAGGACCTGATCATCAAGCTGC CCAAGTACTCCCTGTTCGAGCTGGAGAACGGCCG GAAGCGGATGCTGGCCTCCGCCGGCGAGCTGCAG AAGGGCAACGAGCTGGCCCTGCCCTCCAAGTACG TGAACTTCCTGTACCTGGCCTCCCACTACGAGAAG CTGAAGGGCTCCCCCGAGGACAACGAGCAGAAGC AGCTGTTCGTGGAGCAGCACAAGCACTACCTGGA CGAGATCATCGAGCAGATCTCCGAGTTCTCCAAGC GGGTGATCCTGGCCGACGCCAACCTGGACAAGGT GCTGTCCGCCTACAACAAGCACCGGGACAAGCCC ATCCGGGAGCAGGCCGAGAACATCATCCACCTGT TCACCCTGACCAACCTGGGCGCCCCCGCCGCCTTC

		AAGTACTTCGACACCACCATCGACCGGAAGCGGT ACACCTCCACCAAGGAGGTGCTGGACGCCACCCT GATCCACCAGTCCATCACCGGCCTGTACGAGACCC GGATCGACCTGTCCCAGCTGGGCGGCGACGGCGG CGGCTCCCCCAAGAAGAAGCGGAAGGTGTGA
Открытая рамка считывания Cas9 с меткой Hibit	803	AUGGACAAGAAGUACUCCAUCGGCCUGGACAUC GGCACCAACUCCGUGGGCUGGGCCGUGAUCACCG ACGAGUACAAGGUGCCCUCCAAGAAGUUCAAGG UGCUGGGCAACACCGACCGGCACUCCAUCAAGAA GAACCUGAUCGGCGCCCUGCUGUUCGACUCCGGC GAGACCGCCGAGGCCACCCGGCUGAAGCGGACCG CCCGGCGGCGGUACACCCGGCGGAAGAACCGGAU CUGCUACCUGCAGGAGAUCUUCUCCAACGAGAU GGCCAAGGUGGACGACUCCUUCUUCCACCGGCUG GAGGAGUCCUUCCUGGUGGAGGAGGACAAGAAG CACGAGCGGCACCCCAUCUUCGGCAACAUCGUGG ACGAGGUGGCCUACCACGAGAAGUACCCCACCAU CUACCACCUGCGGAAGAAGCUGGUGGACUCCACC GACAAGGCCGACCUGCGGCUGAUCUACCUGGCCC UGGCCCACAUGAUCAAGUUCCGGGGCCACUUCCU GAUCGAGGGCGACCUGAACCCCGACAACUCCGAC GUGGACAAGCUGUUCAUCCAGCUGGUGCAGACC UACAACCAGCUGUUCGAGGAGAACCCCAUCAAC GCCUCCGGCGUGGACGCCAAGGCCAUCCUGUCCG CCCGGCUGUCCAAGUCCCGGCGGCUGGAGAACCU GAUCGCCCAGCUGCCCGGCGAGAAGAAGAACGG CCUGUUCGGCAACCUGAUCGCCCUGUCCCUGGGC CUGACCCCCAACUUCAAGUCCAACUUCGACCUGG CCGAGGACGCCAAGCUGCAGCUGUCCAAGGACAC CUACGACGACGACCUGGACAACCUGCUGGCCCAG AUCGGCGACCAGUACGCCGACCUGUUCCUGGCCG CCAAGAACCUGUCCGACGCCAUCCUGCUGUCCGA CAUCCUGCGGGUGAACACCGAGAUCACCAAGGCC CCCCUGUCCGCCUCCAUGAUCAAGCGGUACGACG AGCACCACCAGGACCUGACCCUGCUGAAGGCCCU

		GGUGCGGCAGCAGCUGCCCGAGAAGUACAAGGA GAUCUUCUUCGACCAGUCCAAGAACGGCUACGCC GGCUACAUCGACGGCGGCGCCUCCCAGGAGGAG UUCUACAAGUUCAUCAAGCCCAUCCUGGAGAAG AUGGACGGCACCGAGGAGCUGCUGGUGAAGCUG AACCGGGAGGACCUGCUGCGGAAGCAGCGGACC UUCGACAACGGCUCCAUCCCCCACCAGAUCCACC UGGGCGAGCUGCACGCCAUCCUGCGGCGGCAGG AGGACUUCUACCCCUUCCUGAAGGACAACCGGG AGAAGAUCGAGAAGAUCCUGACCUUCCGGAUCC CCUACUACGUGGGCCCCCUGGCCCGGGGCAACUC CCGGUUCGCCUGGAUGACCCGGAAGUCCGAGGA GACCAUCACCCCCUGGAACUUCGAGGAGGUGGU GGACAAGGGCGCCUCCGCCCAGUCCUUCAUCGAG CGGAUGACCAACUUCGACAAGAACCUGCCCAACG AGAAGGUGCUGCCCAAGCACUCCCUGCUGUACG AGUACUUCACCGUGUACAACGAGCUGACCAAGG UGAAGUACGUGACCGAGGGCAUGCGGAAGCCCG CCUUCCUGUCCGGCGAGCAGAAGAAGGCCAUCG UGGACCUGCUGUUCAAGACCAACCGGAAGGUGA CCGUGAAGCAGCUGAAGGAGGACUACUUCAAGA AGAUCGAGUGCUUCGACUCCGUGGAGAUCUCCG GCGUGGAGGACCGGUUCAACGCCUCCCUGGGCAC CUACCACGACCUGCUGAAGAUCAUCAAGGACAA GGACUUCCUGGACAACGAGGAGAACGAGGACAU CCUGGAGGACAUCGUGCUGACCCUGACCCUGUUC GAGGACCGGGAGAUGAUCGAGGAGCGGCUGAAG ACCUACGCCCACCUGUUCGACGACAAGGUGAUG AAGCAGCUGAAGCGGCGGCGGUACACCGGCUGG GGCCGGCUGUCCCGGAAGCUGAUCAACGGCAUCC GGGACAAGCAGUCCGGCAAGACCAUCCUGGACU UCCUGAAGUCCGACGGCUUCGCCAACCGGAACUU CAUGCAGCUGAUCCACGACGACUCCCUGACCUUC AAGGAGGACAUCCAGAAGGCCCAGGUGUCCGGC CAGGGCGACUCCCUGCACGAGCACAUCGCCAACC

		UGGCCGGCUCCCCCGCCAUCAAGAAGGGCAUCCU GCAGACCGUGAAGGUGGUGGACGAGCUGGUGAA GGUGAUGGGCCGGCACAAGCCCGAGAACAUCGU GAUCGAGAUGGCCCGGGAGAACCAGACCACCCA GAAGGGCCAGAAGAACUCCCGGGAGCGGAUGAA GCGGAUCGAGGAGGGCAUCAAGGAGCUGGGCUC CCAGAUCCUGAAGGAGCACCCCGUGGAGAACACC CAGCUGCAGAACGAGAAGCUGUACCUGUACUAC CUGCAGAACGGCCGGGACAUGUACGUGGACCAG GAGCUGGACAUCAACCGGCUGUCCGACUACGAC GUGGACCACAUCGUGCCCCAGUCCUUCCUGAAGG ACGACUCCAUCGACAACAAGGUGCUGACCCGGUC CGACAAGAACCGGGGCAAGUCCGACAACGUGCCC UCCGAGGAGGUGGUGAAGAAGAUGAAGAACUAC UGGCGGCAGCUGCUGAACGCCAAGCUGAUCACCC AGCGGAAGUUCGACAACCUGACCAAGGCCGAGC GGGGCGGCCUGUCCGAGCUGGACAAGGCCGGCU UCAUCAAGCGGCAGCUGGUGGAGACCCGGCAGA UCACCAAGCACGUGGCCCAGAUCCUGGACUCCCG GAUGAACACCAAGUACGACGAGAACGACAAGCU GAUCCGGGAGGUGAAGGUGAUCACCCUGAAGUC CAAGCUGGUGUCCGACUUCCGGAAGGACUUCCA GUUCUACAAGGUGCGGGAGAUCAACAACUACCA CCACGCCCACGACGCCUACCUGAACGCCGUGGUG GGCACCGCCCUGAUCAAGAAGUACCCCAAGCUGG AGUCCGAGUUCGUGUACGGCGACUACAAGGUGU ACGACGUGCGGAAGAUGAUCGCCAAGUCCGAGC AGGAGAUCGGCAAGGCCACCGCCAAGUACUUCU UCUACUCCAACAUCAUGAACUUCUUCAAGACCG AGAUCACCCUGGCCAACGGCGAGAUCCGGAAGC GGCCCCUGAUCGAGACCAACGGCGAGACCGGCGA GAUCGUGUGGGACAAGGGCCGGGACUUCGCCAC CGUGCGGAAGGUGCUGUCCAUGCCCCAGGUGAA CAUCGUGAAGAAGACCGAGGUGCAGACCGGCGG CUUCUCCAAGGAGUCCAUCCUGCCCAAGCGGAAC

		UCCGACAAGCUGAUCGCCCGGAAGAAGGACUGG GACCCCAAGAAGUACGGCGGCUUCGACUCCCCCA CCGUGGCCUACUCCGUGCUGGUGGUGGCCAAGG UGGAGAAGGGCAAGUCCAAGAAGCUGAAGUCCG UGAAGGAGCUGCUGGGCAUCACCAUCAUGGAGC GGUCCUCCUUCGAGAAGAACCCCAUCGACUUCCU GGAGGCCAAGGGCUACAAGGAGGUGAAGAAGGA CCUGAUCAUCAAGCUGCCCAAGUACUCCCUGUUC GAGCUGGAGAACGGCCGGAAGCGGAUGCUGGCC UCCGCCGGCGAGCUGCAGAAGGGCAACGAGCUG GCCCUGCCCUCCAAGUACGUGAACUUCCUGUACC UGGCCUCCCACUACGAGAAGCUGAAGGGCUCCCC CGAGGACAACGAGCAGAAGCAGCUGUUCGUGGA GCAGCACAAGCACUACCUGGACGAGAUCAUCGA GCAGAUCUCCGAGUUCUCCAAGCGGGUGAUCCU GGCCGACGCCAACCUGGACAAGGUGCUGUCCGCC UACAACAAGCACCGGGACAAGCCCAUCCGGGAGC AGGCCGAGAACAUCAUCCACCUGUUCACCCUGAC CAACCUGGGCGCCCCCGCCGCCUUCAAGUACUUC GACACCACCAUCGACCGGAAGCGGUACACCUCCA CCAAGGAGGUGCUGGACGCCACCCUGAUCCACCA GUCCAUCACCGGCCUGUACGAGACCCGGAUCGAC CUGUCCCAGCUGGGCGGCGACGGCGGCGGCUCCC CCAAGAAGAAGCGGAAGGUGUCCGAGUCCGCCA CCCCCGAGUCCGUGUCCGGCUGGCGGCUGUUCAA GAAGAUCUCCUGA
Открытая рамка считывания BC22n	804	AUGGAGGCCUCCCCCGCCUCCGGCCCCCGGCACC UGAUGGACCCCCACAUCUUCACCUCCAACUUCAA CAACGGCAUCGGCCGGCACAAGACCUACCUGUGC UACGAGGUGGAGCGGCUGGACAACGGCACCUCC GUGAAGAUGGACCAGCACCGGGGCUUCCUGCAC AACCAGGCCAAGAACCUGCUGUGCGGCUUCUAC GGCCGGCACGCCGAGCUGCGGUUCCUGGACCUGG UGCCCUCCCUGCAGCUGGACCCCGCCCAGAUCUA CCGGGUGACCUGGUUCAUCUCCUGGUCCCCCUGC

		UUCUCCUGGGGCUGCGCCGGCGAGGUGCGGGCC
		UUCCUGCAGGAGAACACCCACGUGCGGCUGCGG
		AUCUUCGCCGCCCGGAUCUACGACUACGACCCCC
		UGUACAAGGAGGCCCUGCAGAUGCUGCGGGACG
		CCGGCGCCCAGGUGUCCAUCAUGACCUACGACGA
		GUUCAAGCACUGCUGGGACACCUUCGUGGACCA
		CCAGGGCUGCCCCUUCCAGCCCUGGGACGGCCUG
		GACGAGCACUCCCAGGCCCUGUCCGGCCGGCUGC
		GGGCCAUCCUGCAGAACCAGGGCAACUCCGGCUC
		CGAGACCCCCGGCACCUCCGAGUCCGCCACCCCC
		GAGUCCGACAAGAAGUACUCCAUCGGCCUGGCC
		AUCGGCACCAACUCCGUGGGCUGGGCCGUGAUC
		ACCGACGAGUACAAGGUGCCCUCCAAGAAGUUC
		AAGGUGCUGGGCAACACCGACCGGCACUCCAUCA
		AGAAGAACCUGAUCGGCGCCCUGCUGUUCGACU
		CCGGCGAGACCGCCGAGGCCACCCGGCUGAAGCG
		GACCGCCCGGCGGCGGUACACCCGGCGGAAGAAC
		CGGAUCUGCUACCUGCAGGAGAUCUUCUCCAAC
		GAGAUGGCCAAGGUGGACGACUCCUUCUUCCAC
		CGGCUGGAGGAGUCCUUCCUGGUGGAGGAGGAC
		AAGAAGCACGAGCGGCACCCCAUCUUCGGCAACA
		UCGUGGACGAGGUGGCCUACCACGAGAAGUACC
		CCACCAUCUACCACCUGCGGAAGAAGCUGGUGG
		ACUCCACCGACAAGGCCGACCUGCGGCUGAUCUA
		CCUGGCCCUGGCCCACAUGAUCAAGUUCCGGGGC
		CACUUCCUGAUCGAGGGCGACCUGAACCCCGACA
		ACUCCGACGUGGACAAGCUGUUCAUCCAGCUGG
		UGCAGACCUACAACCAGCUGUUCGAGGAGAACC
		CCAUCAACGCCUCCGGCGUGGACGCCAAGGCCAU
		CCUGUCCGCCCGGCUGUCCAAGUCCCGGCGGCUG
		GAGAACCUGAUCGCCCAGCUGCCCGGCGAGAAG
		AAGAACGGCCUGUUCGGCAACCUGAUCGCCCUG
		UCCCUGGGCCUGACCCCCAACUUCAAGUCCAACU
		UCGACCUGGCCGAGGACGCCAAGCUGCAGCUGUC
		CAAGGACACCUACGACGACGACCUGGACAACCUG

		CUGGCCCAGAUCGGCGACCAGUACGCCGACCUGU UCCUGGCCGCCAAGAACCUGUCCGACGCCAUCCU GCUGUCCGACAUCCUGCGGGUGAACACCGAGAU CACCAAGGCCCCCCUGUCCGCCUCCAUGAUCAAG CGGUACGACGAGCACCACCAGGACCUGACCCUGC UGAAGGCCCUGGUGCGGCAGCAGCUGCCCGAGA AGUACAAGGAGAUCUUCUUCGACCAGUCCAAGA ACGGCUACGCCGGCUACAUCGACGGCGGCGCCUC CCAGGAGGAGUUCUACAAGUUCAUCAAGCCCAU CCUGGAGAAGAUGGACGGCACCGAGGAGCUGCU GGUGAAGCUGAACCGGGAGGACCUGCUGCGGAA GCAGCGGACCUUCGACAACGGCUCCAUCCCCCAC CAGAUCCACCUGGGCGAGCUGCACGCCAUCCUGC GGCGGCAGGAGGACUUCUACCCCUUCCUGAAGG ACAACCGGGAGAAGAUCGAGAAGAUCCUGACCU UCCGGAUCCCCUACUACGUGGGCCCCCUGGCCCG GGGCAACUCCCGGUUCGCCUGGAUGACCCGGAA GUCCGAGGAGACCAUCACCCCCUGGAACUUCGAG GAGGUGGUGGACAAGGGCGCCUCCGCCCAGUCC UUCAUCGAGCGGAUGACCAACUUCGACAAGAAC CUGCCCAACGAGAAGGUGCUGCCCAAGCACUCCC UGCUGUACGAGUACUUCACCGUGUACAACGAGC UGACCAAGGUGAAGUACGUGACCGAGGGCAUGC GGAAGCCCGCCUUCCUGUCCGGCGAGCAGAAGA AGGCCAUCGUGGACCUGCUGUUCAAGACCAACC GGAAGGUGACCGUGAAGCAGCUGAAGGAGGACU ACUUCAAGAAGAUCGAGUGCUUCGACUCCGUGG AGAUCUCCGGCGUGGAGGACCGGUUCAACGCCU CCCUGGGCACCUACCACGACCUGCUGAAGAUCAU CAAGGACAAGGACUUCCUGGACAACGAGGAGAA CGAGGACAUCCUGGAGGACAUCGUGCUGACCCU GACCCUGUUCGAGGACCGGGAGAUGAUCGAGGA GCGGCUGAAGACCUACGCCCACCUGUUCGACGAC AAGGUGAUGAAGCAGCUGAAGCGGCGGCGGUAC ACCGGCUGGGGCCGGCUGUCCCGGAAGCUGAUC

		AACGGCAUCCGGGACAAGCAGUCCGGCAAGACC
		AUCCUGGACUUCCUGAAGUCCGACGGCUUCGCCA
		ACCGGAACUUCAUGCAGCUGAUCCACGACGACUC
		CCUGACCUUCAAGGAGGACAUCCAGAAGGCCCA
		GGUGUCCGGCCAGGGCGACUCCCUGCACGAGCAC
		AUCGCCAACCUGGCCGGCUCCCCCGCCAUCAAGA
		AGGGCAUCCUGCAGACCGUGAAGGUGGUGGACG
		AGCUGGUGAAGGUGAUGGGCCGGCACAAGCCCG
		AGAACAUCGUGAUCGAGAUGGCCCGGGAGAACC
		AGACCACCCAGAAGGGCCAGAAGAACUCCCGGG
		AGCGGAUGAAGCGGAUCGAGGAGGGCAUCAAGG
		AGCUGGGCUCCCAGAUCCUGAAGGAGCACCCCGU
		GGAGAACACCCAGCUGCAGAACGAGAAGCUGUA
		CCUGUACUACCUGCAGAACGGCCGGGACAUGUA
		CGUGGACCAGGAGCUGGACAUCAACCGGCUGUC
		CGACUACGACGUGGACCACAUCGUGCCCCAGUCC
		UUCCUGAAGGACGACUCCAUCGACAACAAGGUG
		CUGACCCGGUCCGACAAGAACCGGGGCAAGUCCG
		ACAACGUGCCCUCCGAGGAGGUGGUGAAGAAGA
		UGAAGAACUACUGGCGGCAGCUGCUGAACGCCA
		AGCUGAUCACCCAGCGGAAGUUCGACAACCUGA
		CCAAGGCCGAGCGGGGCGGCCUGUCCGAGCUGG
		ACAAGGCCGGCUUCAUCAAGCGGCAGCUGGUGG
		AGACCCGGCAGAUCACCAAGCACGUGGCCCAGAU
		CCUGGACUCCCGGAUGAACACCAAGUACGACGA
		GAACGACAAGCUGAUCCGGGAGGUGAAGGUGAU
		CACCCUGAAGUCCAAGCUGGUGUCCGACUUCCGG
		AAGGACUUCCAGUUCUACAAGGUGCGGGAGAUC
		AACAACUACCACCACGCCCACGACGCCUACCUGA
		ACGCCGUGGUGGGCACCGCCCUGAUCAAGAAGU
		ACCCCAAGCUGGAGUCCGAGUUCGUGUACGGCG
		ACUACAAGGUGUACGACGUGCGGAAGAUGAUCG
		CCAAGUCCGAGCAGGAGAUCGGCAAGGCCACCGC
		CAAGUACUUCUUCUACUCCAACAUCAUGAACUU
		CUUCAAGACCGAGAUCACCCUGGCCAACGGCGAG

		AUCCGGAAGCGGCCCCUGAUCGAGACCAACGGCG AGACCGGCGAGAUCGUGUGGGACAAGGGCCGGG ACUUCGCCACCGUGCGGAAGGUGCUGUCCAUGCC CCAGGUGAACAUCGUGAAGAAGACCGAGGUGCA GACCGGCGGCUUCUCCAAGGAGUCCAUCCUGCCC AAGCGGAACUCCGACAAGCUGAUCGCCCGGAAG AAGGACUGGGACCCCAAGAAGUACGGCGGCUUC GACUCCCCCACCGUGGCCUACUCCGUGCUGGUGG UGGCCAAGGUGGAGAAGGGCAAGUCCAAGAAGC UGAAGUCCGUGAAGGAGCUGCUGGGCAUCACCA UCAUGGAGCGGUCCUCCUUCGAGAAGAACCCCA UCGACUUCCUGGAGGCCAAGGGCUACAAGGAGG UGAAGAAGGACCUGAUCAUCAAGCUGCCCAAGU ACUCCCUGUUCGAGCUGGAGAACGGCCGGAAGC GGAUGCUGGCCUCCGCCGGCGAGCUGCAGAAGG GCAACGAGCUGGCCCUGCCCUCCAAGUACGUGAA CUUCCUGUACCUGGCCUCCCACUACGAGAAGCUG AAGGGCUCCCCCGAGGACAACGAGCAGAAGCAG CUGUUCGUGGAGCAGCACAAGCACUACCUGGAC GAGAUCAUCGAGCAGAUCUCCGAGUUCUCCAAG CGGGUGAUCCUGGCCGACGCCAACCUGGACAAG GUGCUGUCCGCCUACAACAAGCACCGGGACAAGC CCAUCCGGGAGCAGGCCGAGAACAUCAUCCACCU GUUCACCCUGACCAACCUGGGCGCCCCCGCCGCC UUCAAGUACUUCGACACCACCAUCGACCGGAAGC GGUACACCUCCACCAAGGAGGUGCUGGACGCCAC CCUGAUCCACCAGUCCAUCACCGGCCUGUACGAG ACCCGGAUCGACCUGUCCCAGCUGGGCGGCGACG GCGGCGGCUCCCCCAAGAAGAAGCGGAAGGUGU GA
Открытая рамка считывания BC22n с меткой Hibit	805	AUGGAGGCCUCCCCCGCCUCCGGCCCCCGGCACC UGAUGGACCCCCACAUCUUCACCUCCAACUUCAA CAACGGCAUCGGCCGGCACAAGACCUACCUGUGC UACGAGGUGGAGCGGCUGGACAACGGCACCUCC GUGAAGAUGGACCAGCACCGGGGCUUCCUGCAC

		AACCAGGCCAAGAACCUGCUGUGCGGCUUCUAC GGCCGGCACGCCGAGCUGCGGUUCCUGGACCUGG UGCCCUCCCUGCAGCUGGACCCCGCCCAGAUCUA CCGGGUGACCUGGUUCAUCUCCUGGUCCCCCUGC UUCUCCUGGGGCUGCGCCGGCGAGGUGCGGGCC UUCCUGCAGGAGAACACCCACGUGCGGCUGCGG AUCUUCGCCGCCCGGAUCUACGACUACGACCCCC UGUACAAGGAGGCCCUGCAGAUGCUGCGGGACG CCGGCGCCCAGGUGUCCAUCAUGACCUACGACGA GUUCAAGCACUGCUGGGACACCUUCGUGGACCA CCAGGGCUGCCCCUUCCAGCCCUGGGACGGCCUG GACGAGCACUCCCAGGCCCUGUCCGGCCGGCUGC GGGCCAUCCUGCAGAACCAGGGCAACUCCGGCUC CGAGACCCCCGGCACCUCCGAGUCCGCCACCCCC GAGUCCGACAAGAAGUACUCCAUCGGCCUGGCC AUCGGCACCAACUCCGUGGGCUGGGCCGUGAUC ACCGACGAGUACAAGGUGCCCUCCAAGAAGUUC AAGGUGCUGGGCAACACCGACCGGCACUCCAUCA AGAAGAACCUGAUCGGCGCCCUGCUGUUCGACU CCGGCGAGACCGCCGAGGCCACCCGGCUGAAGCG GACCGCCCGGCGGCGGUACACCCGGCGGAAGAAC CGGAUCUGCUACCUGCAGGAGAUCUUCUCCAAC GAGAUGGCCAAGGUGGACGACUCCUUCUUCCAC CGGCUGGAGGAGUCCUUCCUGGUGGAGGAGGAC AAGAAGCACGAGCGGCACCCCAUCUUCGGCAACA UCGUGGACGAGGUGGCCUACCACGAGAAGUACC CCACCAUCUACCACCUGCGGAAGAAGCUGGUGG ACUCCACCGACAAGGCCGACCUGCGGCUGAUCUA CCUGGCCCUGGCCCACAUGAUCAAGUUCCGGGGC CACUUCCUGAUCGAGGGCGACCUGAACCCCGACA ACUCCGACGUGGACAAGCUGUUCAUCCAGCUGG UGCAGACCUACAACCAGCUGUUCGAGGAGAACC CCAUCAACGCCUCCGGCGUGGACGCCAAGGCCAU CCUGUCCGCCCGGCUGUCCAAGUCCCGGCGGCUG GAGAACCUGAUCGCCCAGCUGCCCGGCGAGAAG

		AAGAACGGCCUGUUCGGCAACCUGAUCGCCCUG UCCCUGGGCCUGACCCCCAACUUCAAGUCCAACU UCGACCUGGCCGAGGACGCCAAGCUGCAGCUGUC CAAGGACACCUACGACGACGACCUGGACAACCUG CUGGCCCAGAUCGGCGACCAGUACGCCGACCUGU UCCUGGCCGCCAAGAACCUGUCCGACGCCAUCCU GCUGUCCGACAUCCUGCGGGUGAACACCGAGAU CACCAAGGCCCCCCUGUCCGCCUCCAUGAUCAAG CGGUACGACGAGCACCACCAGGACCUGACCCUGC UGAAGGCCCUGGUGCGGCAGCAGCUGCCCGAGA AGUACAAGGAGAUCUUCUUCGACCAGUCCAAGA ACGGCUACGCCGGCUACAUCGACGGCGGCGCCUC CCAGGAGGAGUUCUACAAGUUCAUCAAGCCCAU CCUGGAGAAGAUGGACGGCACCGAGGAGCUGCU GGUGAAGCUGAACCGGGAGGACCUGCUGCGGAA GCAGCGGACCUUCGACAACGGCUCCAUCCCCCAC CAGAUCCACCUGGGCGAGCUGCACGCCAUCCUGC GGCGGCAGGAGGACUUCUACCCCUUCCUGAAGG ACAACCGGGAGAAGAUCGAGAAGAUCCUGACCU UCCGGAUCCCCUACUACGUGGGCCCCCUGGCCCG GGGCAACUCCCGGUUCGCCUGGAUGACCCGGAA GUCCGAGGAGACCAUCACCCCCUGGAACUUCGAG GAGGUGGUGGACAAGGGCGCCUCCGCCCAGUCC UUCAUCGAGCGGAUGACCAACUUCGACAAGAAC CUGCCCAACGAGAAGGUGCUGCCCAAGCACUCCC UGCUGUACGAGUACUUCACCGUGUACAACGAGC UGACCAAGGUGAAGUACGUGACCGAGGGCAUGC GGAAGCCCGCCUUCCUGUCCGGCGAGCAGAAGA AGGCCAUCGUGGACCUGCUGUUCAAGACCAACC GGAAGGUGACCGUGAAGCAGCUGAAGGAGGACU ACUUCAAGAAGAUCGAGUGCUUCGACUCCGUGG AGAUCUCCGGCGUGGAGGACCGGUUCAACGCCU CCCUGGGCACCUACCACGACCUGCUGAAGAUCAU CAAGGACAAGGACUUCCUGGACAACGAGGAGAA CGAGGACAUCCUGGAGGACAUCGUGCUGACCCU

		GACCCUGUUCGAGGACCGGGAGAUGAUCGAGGA GCGGCUGAAGACCUACGCCCACCUGUUCGACGAC AAGGUGAUGAAGCAGCUGAAGCGGCGGCGGUAC ACCGGCUGGGGCCGGCUGUCCCGGAAGCUGAUC AACGGCAUCCGGGACAAGCAGUCCGGCAAGACC AUCCUGGACUUCCUGAAGUCCGACGGCUUCGCCA ACCGGAACUUCAUGCAGCUGAUCCACGACGACUC CCUGACCUUCAAGGAGGACAUCCAGAAGGCCCA GGUGUCCGGCCAGGGCGACUCCCUGCACGAGCAC AUCGCCAACCUGGCCGGCUCCCCCGCCAUCAAGA AGGGCAUCCUGCAGACCGUGAAGGUGGUGGACG AGCUGGUGAAGGUGAUGGGCCGGCACAAGCCCG AGAACAUCGUGAUCGAGAUGGCCCGGGAGAACC AGACCACCCAGAAGGGCCAGAAGAACUCCCGGG AGCGGAUGAAGCGGAUCGAGGAGGGCAUCAAGG AGCUGGGCUCCCAGAUCCUGAAGGAGCACCCCGU GGAGAACACCCAGCUGCAGAACGAGAAGCUGUA CCUGUACUACCUGCAGAACGGCCGGGACAUGUA CGUGGACCAGGAGCUGGACAUCAACCGGCUGUC CGACUACGACGUGGACCACAUCGUGCCCCAGUCC UUCCUGAAGGACGACUCCAUCGACAACAAGGUG CUGACCCGGUCCGACAAGAACCGGGGCAAGUCCG ACAACGUGCCCUCCGAGGAGGUGGUGAAGAAGA UGAAGAACUACUGGCGGCAGCUGCUGAACGCCA AGCUGAUCACCCAGCGGAAGUUCGACAACCUGA CCAAGGCCGAGCGGGGCGGCCUGUCCGAGCUGG ACAAGGCCGGCUUCAUCAAGCGGCAGCUGGUGG AGACCCGGCAGAUCACCAAGCACGUGGCCCAGAU CCUGGACUCCCGGAUGAACACCAAGUACGACGA GAACGACAAGCUGAUCCGGGAGGUGAAGGUGAU CACCCUGAAGUCCAAGCUGGUGUCCGACUUCCGG AAGGACUUCCAGUUCUACAAGGUGCGGGAGAUC AACAACUACCACCACGCCCACGACGCCUACCUGA ACGCCGUGGUGGGCACCGCCCUGAUCAAGAAGU ACCCCAAGCUGGAGUCCGAGUUCGUGUACGGCG

		ACUACAAGGUGUACGACGUGCGGAAGAUGAUCG CCAAGUCCGAGCAGGAGAUCGGCAAGGCCACCGC CAAGUACUUCUUCUACUCCAACAUCAUGAACUU CUUCAAGACCGAGAUCACCCUGGCCAACGGCGAG AUCCGGAAGCGGCCCCUGAUCGAGACCAACGGCG AGACCGGCGAGAUCGUGUGGGACAAGGGCCGGG ACUUCGCCACCGUGCGGAAGGUGCUGUCCAUGCC CCAGGUGAACAUCGUGAAGAAGACCGAGGUGCA GACCGGCGGCUUCUCCAAGGAGUCCAUCCUGCCC AAGCGGAACUCCGACAAGCUGAUCGCCCGGAAG AAGGACUGGGACCCCAAGAAGUACGGCGGCUUC GACUCCCCCACCGUGGCCUACUCCGUGCUGGUGG UGGCCAAGGUGGAGAAGGGCAAGUCCAAGAAGC UGAAGUCCGUGAAGGAGCUGCUGGGCAUCACCA UCAUGGAGCGGUCCUCCUUCGAGAAGAACCCCA UCGACUUCCUGGAGGCCAAGGGCUACAAGGAGG UGAAGAAGGACCUGAUCAUCAAGCUGCCCAAGU ACUCCCUGUUCGAGCUGGAGAACGGCCGGAAGC GGAUGCUGGCCUCCGCCGGCGAGCUGCAGAAGG GCAACGAGCUGGCCCUGCCCUCCAAGUACGUGAA CUUCCUGUACCUGGCCUCCCACUACGAGAAGCUG AAGGGCUCCCCCGAGGACAACGAGCAGAAGCAG CUGUUCGUGGAGCAGCACAAGCACUACCUGGAC GAGAUCAUCGAGCAGAUCUCCGAGUUCUCCAAG CGGGUGAUCCUGGCCGACGCCAACCUGGACAAG GUGCUGUCCGCCUACAACAAGCACCGGGACAAGC CCAUCCGGGAGCAGGCCGAGAACAUCAUCCACCU GUUCACCCUGACCAACCUGGGCGCCCCCGCCGCC UUCAAGUACUUCGACACCACCAUCGACCGGAAGC GGUACACCUCCACCAAGGAGGUGCUGGACGCCAC CCUGAUCCACCAGUCCAUCACCGGCCUGUACGAG ACCCGGAUCGACCUGUCCCAGCUGGGCGGCGACG GCGGCGGCUCCCCCAAGAAGAAGCGGAAGGUGU CCGAGUCCGCCACCCCCGAGUCCGUGUCCGGCUG GCGGCUGUUCAAGAAGAUCUCCUGA

Открытая рамка считывания BC22	806	AUGGAAGCAAGCCCGGCAAGCGGACCGAGACAC CUGAUGGACCCGCACAUCUUCACAAGCAACUUCA ACAACGGAAUCGGAAGACACAAGACAUACCUGU GCUACGAAGUCGAAAGACUGGACAACGGAACAA GCGUCAAGAUGGACCAGCACAGAGGAUUCCUGC ACAACCAGGCAAAGAACCUGCUGUGCGGAUUCU ACGGAAGACACGCAGAACUGAGAUUCCUGGACC UGGUCCCGAGCCUGCAGCUGGACCCGGCACAGAU CUACAGAGUCACAUGGUUCAUCAGCUGGAGCCC GUGCUUCAGCUGGGGAUGCGCAGGAGAAGUCAG AGCAUUUCUGCAGGAAAACACACACGUCAGACU GAGAAUCUUCGCAGCAAGAAUCUACGACUACGA CCCGCUGUACAAGGAAGCACUGCAGAUGCUGAG AGACGCAGGAGCACAGGUCAGCAUCAUGACAUA CGACGAAUUCAAGCACUGCUGGGACACAUUCGU CGACCACCAGGGAUGCCCGUUCCAGCCGUGGGAC GGACUGGACGAACACAGCCAGGCACUGAGCGGA AGACUGAGAGCAAUCCUGCAGAACCAGGGAAAC AGCGGAAGCGAAACACCGGGAACAAGCGAAAGC GCAACACCGGAAAGCGACAAGAAGUACAGCAUC GGACUGGCCAUCGGAACAAACAGCGUCGGAUGG GCAGUCAUCACAGACGAAUACAAGGUCCCGAGC AAGAAGUUCAAGGUCCUGGGAAACACAGACAGA CACAGCAUCAAGAAGAACCUGAUCGGAGCACUG CUGUUCGACAGCGGAGAAACAGCAGAAGCAACA AGACUGAAGAGAACAGCAAGAAGAAGAUACACA AGAAGAAAGAACAGAAUCUGCUACCUGCAGGAA AUCUUCAGCAACGAAAUGGCAAAGGUCGACGAC AGCUUCUUCCACAGACUGGAAGAAAGCUUCCUG GUCGAAGAAGACAAGAAGCACGAAAGACACCCG AUCUUCGGAAACAUCGUCGACGAAGUCGCAUAC CACGAAAAGUACCCGACAAUCUACCACCUGAGA AAGAAGCUGGUCGACAGCACAGACAAGGCAGAC CUGAGACUGAUCUACCUGGCACUGGCACACAUG AUCAAGUUCAGAGGACACUUCCUGAUCGAAGGA

		GACCUGAACCCGGACAACAGCGACGUCGACAAGC
		UGUUCAUCCAGCUGGUCCAGACAUACAACCAGC
		UGUUCGAAGAAAACCCGAUCAACGCAAGCGGAG
		UCGACGCAAAGGCAAUCCUGAGCGCAAGACUGA
		GCAAGAGCAGAAGACUGGAAAACCUGAUCGCAC
		AGCUGCCGGGAGAAAAGAAGAACGGACUGUUCG
		GAAACCUGAUCGCACUGAGCCUGGGACUGACAC
		CGAACUUCAAGAGCAACUUCGACCUGGCAGAAG
		ACGCAAAGCUGCAGCUGAGCAAGGACACAUACG
		ACGACGACCUGGACAACCUGCUGGCACAGAUCG
		GAGACCAGUACGCAGACCUGUUCCUGGCAGCAA
		AGAACCUGAGCGACGCAAUCCUGCUGAGCGACA
		UCCUGAGAGUCAACACAGAAAUCACAAAGGCAC
		CGCUGAGCGCAAGCAUGAUCAAGAGAUACGACG
		AACACCACCAGGACCUGACACUGCUGAAGGCACU
		GGUCAGACAGCAGCUGCCGGAAAAGUACAAGGA
		AAUCUUCUUCGACCAGAGCAAGAACGGAUACGC
		AGGAUACAUCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGA
		AUUCUACAAGUUCAUCAAGCCGAUCCUGGAAAA
		GAUGGACGGAACAGAAGAACUGCUGGUCAAGCU
		GAACAGAGAAGACCUGCUGAGAAAGCAGAGAAC
		AUUCGACAACGGAAGCAUCCCGCACCAGAUCCAC
		CUGGGAGAACUGCACGCAAUCCUGAGAAGACAG
		GAAGACUUCUACCCGUUCCUGAAGGACAACAGA
		GAAAAGAUCGAAAAGAUCCUGACAUUCAGAAUC
		CCGUACUACGUCGGACCGCUGGCAAGAGGAAAC
		AGCAGAUUCGCAUGGAUGACAAGAAAGAGCGAA
		GAAACAAUCACACCGUGGAACUUCGAAGAAGUC
		GUCGACAAGGGAGCAAGCGCACAGAGCUUCAUC
		GAAAGAAUGACAAACUUCGACAAGAACCUGCCG
		AACGAAAAGGUCCUGCCGAAGCACAGCCUGCUG
		UACGAAUACUUCACAGUCUACAACGAACUGACA
		AAGGUCAAGUACGUCACAGAAGGAAUGAGAAAG
		CCGGCAUUCCUGAGCGGAGAACAGAAGAAGGCA
		AUCGUCGACCUGCUGUUCAAGACAAACAGAAAG

		GUCACAGUCAAGCAGCUGAAGGAAGACUACUUC
		AAGAAGAUCGAAUGCUUCGACAGCGUCGAAAUC
		AGCGGAGUCGAAGACAGAUUCAACGCAAGCCUG
		GGAACAUACCACGACCUGCUGAAGAUCAUCAAG
		GACAAGGACUUCCUGGACAACGAAGAAAACGAA
		GACAUCCUGGAAGACAUCGUCCUGACACUGACA
		CUGUUCGAAGACAGAGAAAUGAUCGAAGAAAGA
		CUGAAGACAUACGCACACCUGUUCGACGACAAG
		GUCAUGAAGCAGCUGAAGAGAAGAAGAUACACA
		GGAUGGGGAAGACUGAGCAGAAAGCUGAUCAAC
		GGAAUCAGAGACAAGCAGAGCGGAAAGACAAUC
		CUGGACUUCCUGAAGAGCGACGGAUUCGCAAAC
		AGAAACUUCAUGCAGCUGAUCCACGACGACAGC
		CUGACAUUCAAGGAAGACAUCCAGAAGGCACAG
		GUCAGCGGACAGGGAGACAGCCUGCACGAACAC
		AUCGCAAACCUGGCAGGAAGCCCGGCAAUCAAG
		AAGGGAAUCCUGCAGACAGUCAAGGUCGUCGAC
		GAACUGGUCAAGGUCAUGGGAAGACACAAGCCG
		GAAAACAUCGUCAUCGAAAUGGCAAGAGAAAAC
		CAGACAACACAGAAGGGACAGAAGAACAGCAGA
		GAAAGAAUGAAGAGAAUCGAAGAAGGAAUCAAG
		GAACUGGGAAGCCAGAUCCUGAAGGAACACCCG
		GUCGAAAACACACAGCUGCAGAACGAAAAGCUG
		UACCUGUACUACCUGCAGAACGGAAGAGACAUG
		UACGUCGACCAGGAACUGGACAUCAACAGACUG
		AGCGACUACGACGUCGACCACAUCGUCCCGCAGA
		GCUUCCUGAAGGACGACAGCAUCGACAACAAGG
		UCCUGACAAGAAGCGACAAGAACAGAGGAAAGA
		GCGACAACGUCCCGAGCGAAGAAGUCGUCAAGA
		AGAUGAAGAACUACUGGAGACAGCUGCUGAACG
		CAAAGCUGAUCACACAGAGAAAGUUCGACAACC
		UGACAAAGGCAGAGAGAGGAGGACUGAGCGAAC
		UGGACAAGGCAGGAUUCAUCAAGAGACAGCUGG
		UCGAAACAAGACAGAUCACAAAGCACGUCGCAC
		AGAUCCUGGACAGCAGAAUGAACACAAAGUACG

		ACGAAAACGACAAGCUGAUCAGAGAAGUCAAGG UCAUCACACUGAAGAGCAAGCUGGUCAGCGACU UCAGAAAGGACUUCCAGUUCUACAAGGUCAGAG AAAUCAACAACUACCACCACGCACACGACGCAUA CCUGAACGCAGUCGUCGGAACAGCACUGAUCAA GAAGUACCCGAAGCUGGAAAGCGAAUUCGUCUA CGGAGACUACAAGGUCUACGACGUCAGAAAGAU GAUCGCAAAGAGCGAACAGGAAAUCGGAAAGGC AACAGCAAAGUACUUCUUCUACAGCAACAUCAU GAACUUCUUCAAGACAGAAAUCACACUGGCAAA CGGAGAAAUCAGAAAGAGACCGCUGAUCGAAAC AAACGGAGAAACAGGAGAAAUCGUCUGGGACAA GGGAAGAGACUUCGCAACAGUCAGAAAGGUCCU GAGCAUGCCGCAGGUCAACAUCGUCAAGAAGAC AGAAGUCCAGACAGGAGGAUUCAGCAAGGAAAG CAUCCUGCCGAAGAGAAACAGCGACAAGCUGAU CGCAAGAAAGAAGGACUGGGACCCGAAGAAGUA CGGAGGAUUCGACAGCCCGACAGUCGCAUACAG CGUCCUGGUCGUCGCAAAGGUCGAAAAGGGAAA GAGCAAGAAGCUGAAGAGCGUCAAGGAACUGCU GGGAAUCACAAUCAUGGAAAGAAGCAGCUUCGA AAAGAACCCGAUCGACUUCCUGGAAGCAAAGGG AUACAAGGAAGUCAAGAAGGACCUGAUCAUCAA GCUGCCGAAGUACAGCCUGUUCGAACUGGAAAA CGGAAGAAAGAGAAUGCUGGCAAGCGCAGGAGA ACUGCAGAAGGGAAACGAACUGGCACUGCCGAG CAAGUACGUCAACUUCCUGUACCUGGCAAGCCAC UACGAAAAGCUGAAGGGAAGCCCGGAAGACAAC GAACAGAAGCAGCUGUUCGUCGAACAGCACAAG CACUACCUGGACGAAAUCAUCGAACAGAUCAGC GAAUUCAGCAAGAGAGUCAUCCUGGCAGACGCA AACCUGGACAAGGUCCUGAGCGCAUACAACAAG CACAGAGACAAGCCGAUCAGAGAACAGGCAGAA AACAUCAUCCACCUGUUCACACUGACAAACCUGG GAGCACCGGCAGCAUUCAAGUACUUCGACACAA

		CAAUCGACAGAAAGAGAUACACAAGCACAAAGG AAGUCCUGGACGCAACACUGAUCCACCAGAGCA UCACAGGACUGUACGAAACAAGAAUCGAUCUGA GCCAGCUGGGAGGAGACAGCGGAGGAAGCACAA ACCUGAGCGACAUCAUCGAAAAGGAAACAGGAA AGCAGCUGGUCAUCCAGGAAAGCAUCCUGAUGC UGCCGGAAGAAGUCGAAGAAGUCAUCGGAAACA AGCCGGAAAGCGACAUCCUGGUCCACACAGCAU ACGACGAAAGCACAGACGAAAACGUCAUGCUGC UGACAAGCGACGCACCGGAAUACAAGCCGUGGG CACUGGUCAUCCAGGACAGCAACGGAGAAAACA AGAUCAAGAUGCUGAGCGGAGGAAGCCCGAAGA AGAAGAGAAAGGUCUAA
Открытая рамка считывания UGI	807	AUGGGACCGAAGAAGAAGAGAAAGGUCGGAGGA GGAAGCACAAACCUGUCGGACAUCAUCGAAAAG GAAACAGGAAAGCAGCUGGUCAUCCAGGAAUCG AUCCUGAUGCUGCCGGAAGAAGUCGAAGAAGUC AUCGGAAACAAGCCGGAAUCGGACAUCCUGGUC CACACAGCAUACGACGAAUCGACAGACGAAAAC GUCAUGCUGCUGACAUCGGACGCACCGGAAUAC AAGCCGUGGGCACUGGUCAUCCAGGACUCGAAC GGAGAAAACAAGAUCAAGAUGCUGUGA
Открытая рамка считывания UGI	808	AUGACCAACCUGUCCGACAUCAUCGAGAAGGAG ACCGGCAAGCAGCUGGUGAUCCAGGAGUCCAUC CUGAUGCUGCCCGAGGAGGUGGAGGAGGUGAUC GGCAACAAGCCCGAGUCCGACAUCCUGGUGCACA CCGCCUACGACGAGUCCACCGACGAGAACGUGAU GCUGCUGACCUCCGACGCCCCCGAGUACAAGCCC UGGGCCCUGGUGAUCCAGGACUCCAACGGCGAG AACAAGAUCAAGAUGCUGUCCGGCGGCUCCAAG CGGACCGCCGACGGCUCCGAGUUCGAGUCCCCCA AGAAGAAGCGGAAGGUGGAGUGA
Аминокислотная последовательность Cas9, кодируемая	809	MDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLG NTDRHSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYT RRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFFHRLEESFLVEED

SEQ ID No. 801-802		KKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDST DKADLRLIYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVD KLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSKS RRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNF DLAEDAKLQLSKDTYDDDLDNLLAQIGDQYADLFL AAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEH HQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYID GGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRK QRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYPFLKDNRE KIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITP WNFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPK HSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQK KAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISG VEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDI VLTLTLFEDREMIEERLKTYAHLFDDKVMKQLKRRR YTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANR NFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANL AGSPAIKKGILQTVKVVDELVKVMGRHKPENIVIEM ARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQILKEHP VENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSD YDVDHIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVP SEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERG GLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTK YDENDKLIREVKVITLKSKLVSDFRKDFQFYKVREIN NYHHAHDAYLNAVVGTALIKKYPKLESEFVYGDYK VYDVRKMIAKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEIT LANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVL SMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKK DWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKVEKGKSKKLKS VKELLGITIMERSSFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIK LPKYSLFELENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYV NFLYLASHYEKLKGSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEI IEQISEFSKRVILADANLDKVLSAYNKHRDKPIREQA ENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVL DATLIHQSITGLYETRIDLSQLGGDGGGSPKKKRKV

Последовательность аминокислот Cas9 с меткой Hibit	810	MDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLG NTDRHSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYT RRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFFHRLEESFLVEED KKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDST DKADLRLIYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVD KLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSKS RRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNF DLAEDAKLQLSKDTYDDDLDNLLAQIGDQYADLFL AAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEH HQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYID GGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRK QRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYPFLKDNRE KIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITP WNFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPK HSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQK KAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISG VEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDI VLTLTLFEDREMIEERLKTYAHLFDDKVMKQLKRRR YTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANR NFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANL AGSPAIKKGILQTVKVVDELVKVMGRHKPENIVIEM ARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQILKEHP VENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSD YDVDHIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVP SEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERG GLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTK YDENDKLIREVKVITLKSKLVSDFRKDFQFYKVREIN NYHHAHDAYLNAVVGTALIKKYPKLESEFVYGDYK VYDVRKMIAKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEIT LANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVL SMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKK DWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKVEKGKSKKLKS VKELLGITIMERSSFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIK LPKYSLFELENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYV NFLYLASHYEKLKGSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEI

		IEQISEFSKRVILADANLDKVLSAYNKHRDKPIREQA ENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVL DATLIHQSITGLYETRIDLSQLGGDGGGSPKKKRKVS ESATPESVSGWRLFKKIS
Аминокислотная последовательность BC22n	811	MEASPASGPRHLMDPHIFTSNFNNGIGRHKTYLCYE VERLDNGTSVKMDQHRGFLHNQAKNLLCGFYGRH AELRFLDLVPSLQLDPAQIYRVTWFISWSPCFSWGC AGEVRAFLQENTHVRLRIFAARIYDYDPLYKEALQM LRDAGAQVSIMTYDEFKHCWDTFVDHQGCPFQPWD GLDEHSQALSGRLRAILQNQGNSGSETPGTSESATPE SDKKYSIGLAIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLG NTDRHSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYT RRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFFHRLEESFLVEED KKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDST DKADLRLIYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVD KLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSKS RRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNF DLAEDAKLQLSKDTYDDDLDNLLAQIGDQYADLFL AAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEH HQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYID GGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRK QRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYPFLKDNRE KIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITP WNFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPK HSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQK KAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISG VEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDI VLTLTLFEDREMIEERLKTYAHLFDDKVMKQLKRRR YTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANR NFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANL AGSPAIKKGILQTVKVVDELVKVMGRHKPENIVIEM ARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQILKEHP VENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSD YDVDHIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVP SEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERG

		GLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTK YDENDKLIREVKVITLKSKLVSDFRKDFQFYKVREIN NYHHAHDAYLNAVVGTALIKKYPKLESEFVYGDYK VYDVRKMIAKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEIT LANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVL SMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKK DWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKVEKGKSKKLKS VKELLGITIMERSSFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIK LPKYSLFELENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYV NFLYLASHYEKLKGSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEI IEQISEFSKRVILADANLDKVLSAYNKHRDKPIREQA ENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVL DATLIHQSITGLYETRIDLSQLGGDGGGSPKKKRKV*
Последовательность аминокислот BC22n с меткой Hibit	812	MEASPASGPRHLMDPHIFTSNFNNGIGRHKTYLCYE VERLDNGTSVKMDQHRGFLHNQAKNLLCGFYGRH AELRFLDLVPSLQLDPAQIYRVTWFISWSPCFSWGC AGEVRAFLQENTHVRLRIFAARIYDYDPLYKEALQM LRDAGAQVSIMTYDEFKHCWDTFVDHQGCPFQPWD GLDEHSQALSGRLRAILQNQGNSGSETPGTSESATPE SDKKYSIGLAIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLG NTDRHSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYT RRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFFHRLEESFLVEED KKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDST DKADLRLIYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVD KLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSKS RRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNF DLAEDAKLQLSKDTYDDDLDNLLAQIGDQYADLFL AAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEH HQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYID GGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRK QRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYPFLKDNRE KIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITP WNFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPK HSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQK KAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISG

		VEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDI VLTLTLFEDREMIEERLKTYAHLFDDKVMKQLKRRR YTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANR NFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANL AGSPAIKKGILQTVKVVDELVKVMGRHKPENIVIEM ARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQILKEHP VENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSD YDVDHIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVP SEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERG GLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTK YDENDKLIREVKVITLKSKLVSDFRKDFQFYKVREIN NYHHAHDAYLNAVVGTALIKKYPKLESEFVYGDYK VYDVRKMIAKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEIT LANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVL SMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKK DWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKVEKGKSKKLKS VKELLGITIMERSSFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIK LPKYSLFELENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYV NFLYLASHYEKLKGSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEI IEQISEFSKRVILADANLDKVLSAYNKHRDKPIREQA ENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVL DATLIHQSITGLYETRIDLSQLGGDGGGSPKKKRKVS ESATPESVSGWRLFKKIS
Аминокислотная последовательность BC22	813	MEASPASGPRHLMDPHIFTSNFNNGIGRHKTYLCYE VERLDNGTSVKMDQHRGFLHNQAKNLLCGFYGRH AELRFLDLVPSLQLDPAQIYRVTWFISWSPCFSWGC AGEVRAFLQENTHVRLRIFAARIYDYDPLYKEALQM LRDAGAQVSIMTYDEFKHCWDTFVDHQGCPFQPWD GLDEHSQALSGRLRAILQNQGNSGSETPGTSESATPE SDKKYSIGLAIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLG NTDRHSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYT RRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFFHRLEESFLVEED KKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDST DKADLRLIYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVD KLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSKS

		RRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNF DLAEDAKLQLSKDTYDDDLDNLLAQIGDQYADLFL AAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEH HQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYID GGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRK QRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYPFLKDNRE KIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITP WNFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPK HSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQK KAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISG VEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDI VLTLTLFEDREMIEERLKTYAHLFDDKVMKQLKRRR YTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANR NFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANL AGSPAIKKGILQTVKVVDELVKVMGRHKPENIVIEM ARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQILKEHP VENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSD YDVDHIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVP SEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERG GLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTK YDENDKLIREVKVITLKSKLVSDFRKDFQFYKVREIN NYHHAHDAYLNAVVGTALIKKYPKLESEFVYGDYK VYDVRKMIAKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEIT LANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVL SMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKK DWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKVEKGKSKKLKS VKELLGITIMERSSFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIK LPKYSLFELENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYV NFLYLASHYEKLKGSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEI IEQISEFSKRVILADANLDKVLSAYNKHRDKPIREQA ENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVL DATLIHQSITGLYETRIDLSQLGGDSGGSTNLSDIIEK ETGKQLVIQESILMLPEEVEEVIGNKPESDILVHTAY DESTDENVMLLTSDAPEYKPWALVIQDSNGENKIK MLSGGSPKKKRKV

Аминокислотная последовательность UGI	814	MTNLSDIIEKETGKQLVIQESILMLPEEVEEVIGNKPE SDILVHTAYDESTDENVMLLTSDAPEYKPWALVIQD SNGENKIKMLSGGSKRTADGSEFESPKKKRKVE
Примерный XTEN	900	SGSETPGTSESATPES
Примерный XTEN	901	SGSETPGTSESA
Примерный XTEN	902	SGSETPGTSESATPEGGSGGS
аминокислотная последовательность примерного линкера	903	GGGGSEAAAKEAAAK
аминокислотная последовательность примерного линкера	904	EAAAKGGGGSGGGGS
аминокислотная последовательность примерного линкера	905	EAAAKEAAAKEAAAK
аминокислотная последовательность примерного линкера	906	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
аминокислотная последовательность примерного линкера	907	GGGGSGGGGSEAAAKEAAAK
аминокислотная последовательность примерного линкера	908	GGGGSEAAAKGGGGSGGGGS
аминокислотная последовательность примерного линкера	909	EAAAKEAAAKEAAAKGGGGSGGGGS
аминокислотная последовательность примерного линкера	910	EAAAKEAAAKEAAAKEAAAK
аминокислотная последовательность примерного линкера	911	GGGGSEAAAKEAAAKGGGGSEAAAK
аминокислотная	912	EAAAKEAAAKGGGGSGGGGSGGGGS

последовательность примерного линкера		
аминокислотная последовательность примерного линкера	913	EAAAKEAAAKGGGGSGGGGSEAAAK
аминокислотная последовательность примерного линкера	914	GGS
аминокислотная последовательность примерного линкера	915	GGGGS
аминокислотная последовательность примерного линкера	916	EAAAK
аминокислотная последовательность примерного линкера	917	SEGSA
аминокислотная последовательность примерного линкера	918	SEGSAGTST
аминокислотная последовательность примерного линкера	919	GGGGSGGGGS
аминокислотная последовательность примерного линкера	920	GGGGSEAAAK
аминокислотная последовательность примерного линкера	921	EAAAKGGGGS
аминокислотная последовательность примерного линкера	922	EAAAKEAAAK
аминокислотная последовательность	923	SEGSAGTSTESEGSA

примерного линкера		
аминокислотная последовательность примерного линкера	924	GGGGSGGGGSGGGGS
аминокислотная последовательность примерного линкера	925	GGGGSGGGGSEAAAK
аминокислотная последовательность примерного линкера	926	GGGGSEAAAKGGGGS
аминокислотная последовательность примерного линкера	927	EAAAKGGGGSEAAAK
аминокислотная последовательность примерного линкера	928	EAAAKEAAAKGGGGS
аминокислотная последовательность примерного линкера	929	SEGSAGTSTESEGSAGTSTE
аминокислотная последовательность примерного линкера	930	GGGGSGGGGSGGGGSEAAAK
аминокислотная последовательность примерного линкера	931	GGGGSGGGGSEAAAKGGGGS
аминокислотная последовательность примерного линкера	932	GGGGSEAAAKGGGGSEAAAK
аминокислотная последовательность примерного линкера	933	GGGGSEAAAKEAAAKGGGGS
аминокислотная последовательность примерного линкера	934	GGGGSEAAAKEAAAKEAAAK

аминокислотная последовательность примерного линкера	935	EAAAKGGGGSGGGGSGGGGS
аминокислотная последовательность примерного линкера	936	EAAAKGGGGSGGGGSEAAAK
аминокислотная последовательность примерного линкера	937	EAAAKGGGGSEAAAKGGGGS
аминокислотная последовательность примерного линкера	938	EAAAKGGGGSEAAAKEAAAK
аминокислотная последовательность примерного линкера	939	EAAAKEAAAKGGGGSGGGGS
аминокислотная последовательность примерного линкера	940	EAAAKEAAAKGGGGSEAAAK
аминокислотная последовательность примерного линкера	941	EAAAKEAAAKEAAAKGGGGS
аминокислотная последовательность примерного линкера	942	SEGSAGTSTESEGSAGTSTESEGSA
аминокислотная последовательность примерного линкера	943	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
аминокислотная последовательность примерного линкера	944	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEAAAK
аминокислотная последовательность примерного линкера	945	GGGGSGGGGSGGGGSEAAAKGGGGS
аминокислотная	946	GGGGSGGGGSGGGGSEAAAKEAAAK

последовательность примерного линкера		
аминокислотная последовательность примерного линкера	947	GGGGSGGGGSEAAAKGGGGSGGGGS
аминокислотная последовательность примерного линкера	948	GGGGSGGGGSEAAAKGGGGSEAAAK
аминокислотная последовательность примерного линкера	949	GGGGSGGGGSEAAAKEAAAKGGGGS
аминокислотная последовательность примерного линкера	950	GGGGSGGGGSEAAAKEAAAKEAAAK
аминокислотная последовательность примерного линкера	951	GGGGSEAAAKGGGGSGGGGSGGGGS
аминокислотная последовательность примерного линкера	952	GGGGSEAAAKGGGGSGGGGSEAAAK
аминокислотная последовательность примерного линкера	953	GGGGSEAAAKGGGGSEAAAKGGGGS
аминокислотная последовательность примерного линкера	954	GGGGSEAAAKGGGGSEAAAKEAAAK
аминокислотная последовательность примерного линкера	955	GGGGSEAAAKEAAAKGGGGSGGGGS
аминокислотная последовательность примерного линкера	956	GGGGSEAAAKEAAAKEAAAKGGGGS
аминокислотная последовательность	957	GGGGSEAAAKEAAAKEAAAKEAAAK

примерного линкера		
аминокислотная последовательность примерного линкера	958	EAAAKGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
аминокислотная последовательность примерного линкера	959	EAAAKGGGGSGGGGSGGGGSEAAAK
аминокислотная последовательность примерного линкера	960	EAAAKGGGGSGGGGSEAAAKGGGGS
аминокислотная последовательность примерного линкера	961	EAAAKGGGGSGGGGSEAAAKEAAAK
аминокислотная последовательность примерного линкера	962	EAAAKGGGGSEAAAKGGGGSGGGGS
аминокислотная последовательность примерного линкера	963	EAAAKGGGGSEAAAKGGGGSEAAAK
аминокислотная последовательность примерного линкера	964	EAAAKGGGGSEAAAKEAAAKGGGGS
аминокислотная последовательность примерного линкера	965	EAAAKGGGGSEAAAKEAAAKEAAAK
аминокислотная последовательность примерного линкера	966	EAAAKEAAAKGGGGSEAAAKGGGGS
аминокислотная последовательность примерного линкера	967	EAAAKEAAAKGGGGSEAAAKEAAAK
аминокислотная последовательность примерного линкера	968	EAAAKEAAAKEAAAKGGGGSEAAAK

аминокислотная последовательность примерного линкера	969	EAAAKEAAAKEAAAKEAAAKGGGGS
аминокислотная последовательность примерного линкера	970	EAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAK
Аминокислотная последовательность примерного линкера SGGS	971	SGGS
мРНК, кодирующая BC22n	972	GGGAAGCUCAGAAUAAACGCUCAACUUUGGCCG GAUCUGCCACCAUGGAGGCCUCCCCCGCCUCCGG CCCCCGGCACCUGAUGGACCCCCACAUCUUCACC UCCAACUUCAACAACGGCAUCGGCCGGCACAAGA CCUACCUGUGCUACGAGGUGGAGCGGCUGGACA ACGGCACCUCCGUGAAGAUGGACCAGCACCGGG GCUUCCUGCACAACCAGGCCAAGAACCUGCUGUG CGGCUUCUACGGCCGGCACGCCGAGCUGCGGUUC CUGGACCUGGUGCCCUCCCUGCAGCUGGACCCCG CCCAGAUCUACCGGGUGACCUGGUUCAUCUCCUG GUCCCCCUGCUUCUCCUGGGGCUGCGCCGGCGAG GUGCGGGCCUUCCUGCAGGAGAACACCCACGUGC GGCUGCGGAUCUUCGCCGCCCGGAUCUACGACUA CGACCCCCUGUACAAGGAGGCCCUGCAGAUGCUG CGGGACGCCGGCGCCCAGGUGUCCAUCAUGACCU ACGACGAGUUCAAGCACUGCUGGGACACCUUCG UGGACCACCAGGGCUGCCCCUUCCAGCCCUGGGA CGGCCUGGACGAGCACUCCCAGGCCCUGUCCGGC CGGCUGCGGGCCAUCCUGCAGAACCAGGGCAACU CCGGCUCCGAGACCCCCGGCACCUCCGAGUCCGC CACCCCCGAGUCCGACAAGAAGUACUCCAUCGGC CUGGCCAUCGGCACCAACUCCGUGGGCUGGGCCG UGAUCACCGACGAGUACAAGGUGCCCUCCAAGA AGUUCAAGGUGCUGGGCAACACCGACCGGCACU CCAUCAAGAAGAACCUGAUCGGCGCCCUGCUGU

		UCGACUCCGGCGAGACCGCCGAGGCCACCCGGCU
		GAAGCGGACCGCCCGGCGGCGGUACACCCGGCGG
		AAGAACCGGAUCUGCUACCUGCAGGAGAUCUUC
		UCCAACGAGAUGGCCAAGGUGGACGACUCCUUC
		UUCCACCGGCUGGAGGAGUCCUUCCUGGUGGAG
		GAGGACAAGAAGCACGAGCGGCACCCCAUCUUC
		GGCAACAUCGUGGACGAGGUGGCCUACCACGAG
		AAGUACCCCACCAUCUACCACCUGCGGAAGAAGC
		UGGUGGACUCCACCGACAAGGCCGACCUGCGGCU
		GAUCUACCUGGCCCUGGCCCACAUGAUCAAGUUC
		CGGGGCCACUUCCUGAUCGAGGGCGACCUGAACC
		CCGACAACUCCGACGUGGACAAGCUGUUCAUCCA
		GCUGGUGCAGACCUACAACCAGCUGUUCGAGGA
		GAACCCCAUCAACGCCUCCGGCGUGGACGCCAAG
		GCCAUCCUGUCCGCCCGGCUGUCCAAGUCCCGGC
		GGCUGGAGAACCUGAUCGCCCAGCUGCCCGGCGA
		GAAGAAGAACGGCCUGUUCGGCAACCUGAUCGC
		CCUGUCCCUGGGCCUGACCCCCAACUUCAAGUCC
		AACUUCGACCUGGCCGAGGACGCCAAGCUGCAGC
		UGUCCAAGGACACCUACGACGACGACCUGGACA
		ACCUGCUGGCCCAGAUCGGCGACCAGUACGCCGA
		CCUGUUCCUGGCCGCCAAGAACCUGUCCGACGCC
		AUCCUGCUGUCCGACAUCCUGCGGGUGAACACCG
		AGAUCACCAAGGCCCCCCUGUCCGCCUCCAUGAU
		CAAGCGGUACGACGAGCACCACCAGGACCUGACC
		CUGCUGAAGGCCCUGGUGCGGCAGCAGCUGCCCG
		AGAAGUACAAGGAGAUCUUCUUCGACCAGUCCA
		AGAACGGCUACGCCGGCUACAUCGACGGCGGCGC
		CUCCCAGGAGGAGUUCUACAAGUUCAUCAAGCC
		CAUCCUGGAGAAGAUGGACGGCACCGAGGAGCU
		GCUGGUGAAGCUGAACCGGGAGGACCUGCUGCG
		GAAGCAGCGGACCUUCGACAACGGCUCCAUCCCC
		CACCAGAUCCACCUGGGCGAGCUGCACGCCAUCC
		UGCGGCGGCAGGAGGACUUCUACCCCUUCCUGA
		AGGACAACCGGGAGAAGAUCGAGAAGAUCCUGA

		CCUUCCGGAUCCCCUACUACGUGGGCCCCCUGGC
		CCGGGGCAACUCCCGGUUCGCCUGGAUGACCCGG
		AAGUCCGAGGAGACCAUCACCCCCUGGAACUUCG
		AGGAGGUGGUGGACAAGGGCGCCUCCGCCCAGU
		CCUUCAUCGAGCGGAUGACCAACUUCGACAAGA
		ACCUGCCCAACGAGAAGGUGCUGCCCAAGCACUC
		CCUGCUGUACGAGUACUUCACCGUGUACAACGA
		GCUGACCAAGGUGAAGUACGUGACCGAGGGCAU
		GCGGAAGCCCGCCUUCCUGUCCGGCGAGCAGAAG
		AAGGCCAUCGUGGACCUGCUGUUCAAGACCAAC
		CGGAAGGUGACCGUGAAGCAGCUGAAGGAGGAC
		UACUUCAAGAAGAUCGAGUGCUUCGACUCCGUG
		GAGAUCUCCGGCGUGGAGGACCGGUUCAACGCC
		UCCCUGGGCACCUACCACGACCUGCUGAAGAUCA
		UCAAGGACAAGGACUUCCUGGACAACGAGGAGA
		ACGAGGACAUCCUGGAGGACAUCGUGCUGACCC
		UGACCCUGUUCGAGGACCGGGAGAUGAUCGAGG
		AGCGGCUGAAGACCUACGCCCACCUGUUCGACGA
		CAAGGUGAUGAAGCAGCUGAAGCGGCGGCGGUA
		CACCGGCUGGGGCCGGCUGUCCCGGAAGCUGAUC
		AACGGCAUCCGGGACAAGCAGUCCGGCAAGACC
		AUCCUGGACUUCCUGAAGUCCGACGGCUUCGCCA
		ACCGGAACUUCAUGCAGCUGAUCCACGACGACUC
		CCUGACCUUCAAGGAGGACAUCCAGAAGGCCCA
		GGUGUCCGGCCAGGGCGACUCCCUGCACGAGCAC
		AUCGCCAACCUGGCCGGCUCCCCCGCCAUCAAGA
		AGGGCAUCCUGCAGACCGUGAAGGUGGUGGACG
		AGCUGGUGAAGGUGAUGGGCCGGCACAAGCCCG
		AGAACAUCGUGAUCGAGAUGGCCCGGGAGAACC
		AGACCACCCAGAAGGGCCAGAAGAACUCCCGGG
		AGCGGAUGAAGCGGAUCGAGGAGGGCAUCAAGG
		AGCUGGGCUCCCAGAUCCUGAAGGAGCACCCCGU
		GGAGAACACCCAGCUGCAGAACGAGAAGCUGUA
		CCUGUACUACCUGCAGAACGGCCGGGACAUGUA
		CGUGGACCAGGAGCUGGACAUCAACCGGCUGUC

		CGACUACGACGUGGACCACAUCGUGCCCCAGUCC UUCCUGAAGGACGACUCCAUCGACAACAAGGUG CUGACCCGGUCCGACAAGAACCGGGGCAAGUCCG ACAACGUGCCCUCCGAGGAGGUGGUGAAGAAGA UGAAGAACUACUGGCGGCAGCUGCUGAACGCCA AGCUGAUCACCCAGCGGAAGUUCGACAACCUGA CCAAGGCCGAGCGGGGCGGCCUGUCCGAGCUGG ACAAGGCCGGCUUCAUCAAGCGGCAGCUGGUGG AGACCCGGCAGAUCACCAAGCACGUGGCCCAGAU CCUGGACUCCCGGAUGAACACCAAGUACGACGA GAACGACAAGCUGAUCCGGGAGGUGAAGGUGAU CACCCUGAAGUCCAAGCUGGUGUCCGACUUCCGG AAGGACUUCCAGUUCUACAAGGUGCGGGAGAUC AACAACUACCACCACGCCCACGACGCCUACCUGA ACGCCGUGGUGGGCACCGCCCUGAUCAAGAAGU ACCCCAAGCUGGAGUCCGAGUUCGUGUACGGCG ACUACAAGGUGUACGACGUGCGGAAGAUGAUCG CCAAGUCCGAGCAGGAGAUCGGCAAGGCCACCGC CAAGUACUUCUUCUACUCCAACAUCAUGAACUU CUUCAAGACCGAGAUCACCCUGGCCAACGGCGAG AUCCGGAAGCGGCCCCUGAUCGAGACCAACGGCG AGACCGGCGAGAUCGUGUGGGACAAGGGCCGGG ACUUCGCCACCGUGCGGAAGGUGCUGUCCAUGCC CCAGGUGAACAUCGUGAAGAAGACCGAGGUGCA GACCGGCGGCUUCUCCAAGGAGUCCAUCCUGCCC AAGCGGAACUCCGACAAGCUGAUCGCCCGGAAG AAGGACUGGGACCCCAAGAAGUACGGCGGCUUC GACUCCCCCACCGUGGCCUACUCCGUGCUGGUGG UGGCCAAGGUGGAGAAGGGCAAGUCCAAGAAGC UGAAGUCCGUGAAGGAGCUGCUGGGCAUCACCA UCAUGGAGCGGUCCUCCUUCGAGAAGAACCCCA UCGACUUCCUGGAGGCCAAGGGCUACAAGGAGG UGAAGAAGGACCUGAUCAUCAAGCUGCCCAAGU ACUCCCUGUUCGAGCUGGAGAACGGCCGGAAGC GGAUGCUGGCCUCCGCCGGCGAGCUGCAGAAGG

		GCAACGAGCUGGCCCUGCCCUCCAAGUACGUGAA CUUCCUGUACCUGGCCUCCCACUACGAGAAGCUG AAGGGCUCCCCCGAGGACAACGAGCAGAAGCAG CUGUUCGUGGAGCAGCACAAGCACUACCUGGAC GAGAUCAUCGAGCAGAUCUCCGAGUUCUCCAAG CGGGUGAUCCUGGCCGACGCCAACCUGGACAAG GUGCUGUCCGCCUACAACAAGCACCGGGACAAGC CCAUCCGGGAGCAGGCCGAGAACAUCAUCCACCU GUUCACCCUGACCAACCUGGGCGCCCCCGCCGCC UUCAAGUACUUCGACACCACCAUCGACCGGAAGC GGUACACCUCCACCAAGGAGGUGCUGGACGCCAC CCUGAUCCACCAGUCCAUCACCGGCCUGUACGAG ACCCGGAUCGACCUGUCCCAGCUGGGCGGCGACG GCGGCGGCUCCCCCAAGAAGAAGCGGAAGGUGU GACUAGCACCAGCCUCAAGAACACCCGAAUGGA GUCUCUAAGCUACAUAAUACCAACUUACACUUU ACAAAAUGUUGUCCCCCAAAAUGUAGCCAUUCG UAUCUGCUCCUAAUAAAAAGAAAGUUUCUUCAC AUUCUCUCGAGAAAAAAAAAAAAUGGAAAAAAA AAAAACGGAAAAAAAAAAAAGGUAAAAAAAAAA AAUAUAAAAAAAAAAAAACAUAAAAAAAAAAAAC GAAAAAAAAAAAACGUAAAAAAAAAAAACUCAA AAAAAAAAAAGAUAAAAAAAAAAAACCUAAAAA AAAAAAAUGUAAAAAAAAAAAAGGGAAAAAAAA AAAACGCAAAAAAAAAAAAACACAAAAAAAAAAA AUGCAAAAAAAAAAAAAUCGAAAAAAAAAAAAUC UAAAAAAAAAAAAACGAAAAAAAAAAAACCCAAA AAAAAAAAAGACAAAAAAAAAAAAUAGAAAAAA AAAAAAGUUAAAAAAAAAAAACUGAAAAAAAAA AAAUUUAAAAAAAAAAAAUCUAG
мРНК, кодирующая BC22n с меткой HiBit	973	GGGAAGCUCAGAAUAAACGCUCAACUUUGGCCG GAUCUGCCACCAUGGAGGCCUCCCCCGCCUCCGG CCCCCGGCACCUGAUGGACCCCCACAUCUUCACC UCCAACUUCAACAACGGCAUCGGCCGGCACAAGA CCUACCUGUGCUACGAGGUGGAGCGGCUGGACA

		ACGGCACCUCCGUGAAGAUGGACCAGCACCGGG
		GCUUCCUGCACAACCAGGCCAAGAACCUGCUGUG
		CGGCUUCUACGGCCGGCACGCCGAGCUGCGGUUC
		CUGGACCUGGUGCCCUCCCUGCAGCUGGACCCCG
		CCCAGAUCUACCGGGUGACCUGGUUCAUCUCCUG
		GUCCCCCUGCUUCUCCUGGGGCUGCGCCGGCGAG
		GUGCGGGCCUUCCUGCAGGAGAACACCCACGUGC
		GGCUGCGGAUCUUCGCCGCCCGGAUCUACGACUA
		CGACCCCCUGUACAAGGAGGCCCUGCAGAUGCUG
		CGGGACGCCGGCGCCCAGGUGUCCAUCAUGACCU
		ACGACGAGUUCAAGCACUGCUGGGACACCUUCG
		UGGACCACCAGGGCUGCCCCUUCCAGCCCUGGGA
		CGGCCUGGACGAGCACUCCCAGGCCCUGUCCGGC
		CGGCUGCGGGCCAUCCUGCAGAACCAGGGCAACU
		CCGGCUCCGAGACCCCCGGCACCUCCGAGUCCGC
		CACCCCCGAGUCCGACAAGAAGUACUCCAUCGGC
		CUGGCCAUCGGCACCAACUCCGUGGGCUGGGCCG
		UGAUCACCGACGAGUACAAGGUGCCCUCCAAGA
		AGUUCAAGGUGCUGGGCAACACCGACCGGCACU
		CCAUCAAGAAGAACCUGAUCGGCGCCCUGCUGU
		UCGACUCCGGCGAGACCGCCGAGGCCACCCGGCU
		GAAGCGGACCGCCCGGCGGCGGUACACCCGGCGG
		AAGAACCGGAUCUGCUACCUGCAGGAGAUCUUC
		UCCAACGAGAUGGCCAAGGUGGACGACUCCUUC
		UUCCACCGGCUGGAGGAGUCCUUCCUGGUGGAG
		GAGGACAAGAAGCACGAGCGGCACCCCAUCUUC
		GGCAACAUCGUGGACGAGGUGGCCUACCACGAG
		AAGUACCCCACCAUCUACCACCUGCGGAAGAAGC
		UGGUGGACUCCACCGACAAGGCCGACCUGCGGCU
		GAUCUACCUGGCCCUGGCCCACAUGAUCAAGUUC
		CGGGGCCACUUCCUGAUCGAGGGCGACCUGAACC
		CCGACAACUCCGACGUGGACAAGCUGUUCAUCCA
		GCUGGUGCAGACCUACAACCAGCUGUUCGAGGA
		GAACCCCAUCAACGCCUCCGGCGUGGACGCCAAG
		GCCAUCCUGUCCGCCCGGCUGUCCAAGUCCCGGC

		GGCUGGAGAACCUGAUCGCCCAGCUGCCCGGCGA GAAGAAGAACGGCCUGUUCGGCAACCUGAUCGC CCUGUCCCUGGGCCUGACCCCCAACUUCAAGUCC AACUUCGACCUGGCCGAGGACGCCAAGCUGCAGC UGUCCAAGGACACCUACGACGACGACCUGGACA ACCUGCUGGCCCAGAUCGGCGACCAGUACGCCGA CCUGUUCCUGGCCGCCAAGAACCUGUCCGACGCC AUCCUGCUGUCCGACAUCCUGCGGGUGAACACCG AGAUCACCAAGGCCCCCCUGUCCGCCUCCAUGAU CAAGCGGUACGACGAGCACCACCAGGACCUGACC CUGCUGAAGGCCCUGGUGCGGCAGCAGCUGCCCG AGAAGUACAAGGAGAUCUUCUUCGACCAGUCCA AGAACGGCUACGCCGGCUACAUCGACGGCGGCGC CUCCCAGGAGGAGUUCUACAAGUUCAUCAAGCC CAUCCUGGAGAAGAUGGACGGCACCGAGGAGCU GCUGGUGAAGCUGAACCGGGAGGACCUGCUGCG GAAGCAGCGGACCUUCGACAACGGCUCCAUCCCC CACCAGAUCCACCUGGGCGAGCUGCACGCCAUCC UGCGGCGGCAGGAGGACUUCUACCCCUUCCUGA AGGACAACCGGGAGAAGAUCGAGAAGAUCCUGA CCUUCCGGAUCCCCUACUACGUGGGCCCCCUGGC CCGGGGCAACUCCCGGUUCGCCUGGAUGACCCGG AAGUCCGAGGAGACCAUCACCCCCUGGAACUUCG AGGAGGUGGUGGACAAGGGCGCCUCCGCCCAGU CCUUCAUCGAGCGGAUGACCAACUUCGACAAGA ACCUGCCCAACGAGAAGGUGCUGCCCAAGCACUC CCUGCUGUACGAGUACUUCACCGUGUACAACGA GCUGACCAAGGUGAAGUACGUGACCGAGGGCAU GCGGAAGCCCGCCUUCCUGUCCGGCGAGCAGAAG AAGGCCAUCGUGGACCUGCUGUUCAAGACCAAC CGGAAGGUGACCGUGAAGCAGCUGAAGGAGGAC UACUUCAAGAAGAUCGAGUGCUUCGACUCCGUG GAGAUCUCCGGCGUGGAGGACCGGUUCAACGCC UCCCUGGGCACCUACCACGACCUGCUGAAGAUCA UCAAGGACAAGGACUUCCUGGACAACGAGGAGA

		ACGAGGACAUCCUGGAGGACAUCGUGCUGACCC UGACCCUGUUCGAGGACCGGGAGAUGAUCGAGG AGCGGCUGAAGACCUACGCCCACCUGUUCGACGA CAAGGUGAUGAAGCAGCUGAAGCGGCGGCGGUA CACCGGCUGGGGCCGGCUGUCCCGGAAGCUGAUC AACGGCAUCCGGGACAAGCAGUCCGGCAAGACC AUCCUGGACUUCCUGAAGUCCGACGGCUUCGCCA ACCGGAACUUCAUGCAGCUGAUCCACGACGACUC CCUGACCUUCAAGGAGGACAUCCAGAAGGCCCA GGUGUCCGGCCAGGGCGACUCCCUGCACGAGCAC AUCGCCAACCUGGCCGGCUCCCCCGCCAUCAAGA AGGGCAUCCUGCAGACCGUGAAGGUGGUGGACG AGCUGGUGAAGGUGAUGGGCCGGCACAAGCCCG AGAACAUCGUGAUCGAGAUGGCCCGGGAGAACC AGACCACCCAGAAGGGCCAGAAGAACUCCCGGG AGCGGAUGAAGCGGAUCGAGGAGGGCAUCAAGG AGCUGGGCUCCCAGAUCCUGAAGGAGCACCCCGU GGAGAACACCCAGCUGCAGAACGAGAAGCUGUA CCUGUACUACCUGCAGAACGGCCGGGACAUGUA CGUGGACCAGGAGCUGGACAUCAACCGGCUGUC CGACUACGACGUGGACCACAUCGUGCCCCAGUCC UUCCUGAAGGACGACUCCAUCGACAACAAGGUG CUGACCCGGUCCGACAAGAACCGGGGCAAGUCCG ACAACGUGCCCUCCGAGGAGGUGGUGAAGAAGA UGAAGAACUACUGGCGGCAGCUGCUGAACGCCA AGCUGAUCACCCAGCGGAAGUUCGACAACCUGA CCAAGGCCGAGCGGGGCGGCCUGUCCGAGCUGG ACAAGGCCGGCUUCAUCAAGCGGCAGCUGGUGG AGACCCGGCAGAUCACCAAGCACGUGGCCCAGAU CCUGGACUCCCGGAUGAACACCAAGUACGACGA GAACGACAAGCUGAUCCGGGAGGUGAAGGUGAU CACCCUGAAGUCCAAGCUGGUGUCCGACUUCCGG AAGGACUUCCAGUUCUACAAGGUGCGGGAGAUC AACAACUACCACCACGCCCACGACGCCUACCUGA ACGCCGUGGUGGGCACCGCCCUGAUCAAGAAGU

		ACCCCAAGCUGGAGUCCGAGUUCGUGUACGGCG
		ACUACAAGGUGUACGACGUGCGGAAGAUGAUCG
		CCAAGUCCGAGCAGGAGAUCGGCAAGGCCACCGC
		CAAGUACUUCUUCUACUCCAACAUCAUGAACUU
		CUUCAAGACCGAGAUCACCCUGGCCAACGGCGAG
		AUCCGGAAGCGGCCCCUGAUCGAGACCAACGGCG
		AGACCGGCGAGAUCGUGUGGGACAAGGGCCGGG
		ACUUCGCCACCGUGCGGAAGGUGCUGUCCAUGCC
		CCAGGUGAACAUCGUGAAGAAGACCGAGGUGCA
		GACCGGCGGCUUCUCCAAGGAGUCCAUCCUGCCC
		AAGCGGAACUCCGACAAGCUGAUCGCCCGGAAG
		AAGGACUGGGACCCCAAGAAGUACGGCGGCUUC
		GACUCCCCCACCGUGGCCUACUCCGUGCUGGUGG
		UGGCCAAGGUGGAGAAGGGCAAGUCCAAGAAGC
		UGAAGUCCGUGAAGGAGCUGCUGGGCAUCACCA
		UCAUGGAGCGGUCCUCCUUCGAGAAGAACCCCA
		UCGACUUCCUGGAGGCCAAGGGCUACAAGGAGG
		UGAAGAAGGACCUGAUCAUCAAGCUGCCCAAGU
		ACUCCCUGUUCGAGCUGGAGAACGGCCGGAAGC
		GGAUGCUGGCCUCCGCCGGCGAGCUGCAGAAGG
		GCAACGAGCUGGCCCUGCCCUCCAAGUACGUGAA
		CUUCCUGUACCUGGCCUCCCACUACGAGAAGCUG
		AAGGGCUCCCCCGAGGACAACGAGCAGAAGCAG
		CUGUUCGUGGAGCAGCACAAGCACUACCUGGAC
		GAGAUCAUCGAGCAGAUCUCCGAGUUCUCCAAG
		CGGGUGAUCCUGGCCGACGCCAACCUGGACAAG
		GUGCUGUCCGCCUACAACAAGCACCGGGACAAGC
		CCAUCCGGGAGCAGGCCGAGAACAUCAUCCACCU
		GUUCACCCUGACCAACCUGGGCGCCCCCGCCGCC
		UUCAAGUACUUCGACACCACCAUCGACCGGAAGC
		GGUACACCUCCACCAAGGAGGUGCUGGACGCCAC
		CCUGAUCCACCAGUCCAUCACCGGCCUGUACGAG
		ACCCGGAUCGACCUGUCCCAGCUGGGCGGCGACG
		GCGGCGGCUCCCCCAAGAAGAAGCGGAAGGUGU
		CCGAGUCCGCCACCCCCGAGUCCGUGUCCGGCUG

		GCGGCUGUUCAAGAAGAUCUCCUGACUAGCACC AGCCUCAAGAACACCCGAAUGGAGUCUCUAAGC UACAUAAUACCAACUUACACUUUACAAAAUGUU GUCCCCCAAAAUGUAGCCAUUCGUAUCUGCUCCU AAUAAAAAGAAAGUUUCUUCACAUUCUCUCGAG AAAAAAAAAAAAUGGAAAAAAAAAAAACGGAAA AAAAAAAAAGGUAAAAAAAAAAAAUAUAAAAAA AAAAAACAUAAAAAAAAAAAACGAAAAAAAAAA AACGUAAAAAAAAAAAACUCAAAAAAAAAAAAG AUAAAAAAAAAAAACCUAAAAAAAAAAAAUGUA AAAAAAAAAAGGGAAAAAAAAAAAACGCAAAA AAAAAAAACACAAAAAAAAAAAUGCAAAAAAA AAAAAUCGAAAAAAAAAAAAUCUAAAAAAAAAA AACGAAAAAAAAAAAACCCAAAAAAAAAAAAGA CAAAAAAAAAAAAUAGAAAAAAAAAAAAGUUAA AAAAAAAAAACUGAAAAAAAAAAAAUUUAAAAA AAAAAAAUCUAG
мРНК, кодирующая BC22	974	GGGAGACCCAAGCUGGCUAGCGUUUAAACUUAA GCUUUCCCGCAGUCGGCGUCCAGCGGCUCUGCUU GUUCGUGUGUGUGUCGUUGCAGGCCUUAUUCGG AUCCGCCACCAUGGAAGCAAGCCCGGCAAGCGGA CCGAGACACCUGAUGGACCCGCACAUCUUCACAA GCAACUUCAACAACGGAAUCGGAAGACACAAGA CAUACCUGUGCUACGAAGUCGAAAGACUGGACA ACGGAACAAGCGUCAAGAUGGACCAGCACAGAG GAUUCCUGCACAACCAGGCAAAGAACCUGCUGU GCGGAUUCUACGGAAGACACGCAGAACUGAGAU UCCUGGACCUGGUCCCGAGCCUGCAGCUGGACCC GGCACAGAUCUACAGAGUCACAUGGUUCAUCAG CUGGAGCCCGUGCUUCAGCUGGGGAUGCGCAGG AGAAGUCAGAGCAUUUCUGCAGGAAAACACACA CGUCAGACUGAGAAUCUUCGCAGCAAGAAUCUA CGACUACGACCCGCUGUACAAGGAAGCACUGCA GAUGCUGAGAGACGCAGGAGCACAGGUCAGCAU CAUGACAUACGACGAAUUCAAGCACUGCUGGGA

		CACAUUCGUCGACCACCAGGGAUGCCCGUUCCAG
		CCGUGGGACGGACUGGACGAACACAGCCAGGCA
		CUGAGCGGAAGACUGAGAGCAAUCCUGCAGAAC
		CAGGGAAACAGCGGAAGCGAAACACCGGGAACA
		AGCGAAAGCGCAACACCGGAAAGCGACAAGAAG
		UACAGCAUCGGACUGGCCAUCGGAACAAACAGC
		GUCGGAUGGGCAGUCAUCACAGACGAAUACAAG
		GUCCCGAGCAAGAAGUUCAAGGUCCUGGGAAAC
		ACAGACAGACACAGCAUCAAGAAGAACCUGAUC
		GGAGCACUGCUGUUCGACAGCGGAGAAACAGCA
		GAAGCAACAAGACUGAAGAGAACAGCAAGAAGA
		AGAUACACAAGAAGAAAGAACAGAAUCUGCUAC
		CUGCAGGAAAUCUUCAGCAACGAAAUGGCAAAG
		GUCGACGACAGCUUCUUCCACAGACUGGAAGAA
		AGCUUCCUGGUCGAAGAAGACAAGAAGCACGAA
		AGACACCCGAUCUUCGGAAACAUCGUCGACGAA
		GUCGCAUACCACGAAAAGUACCCGACAAUCUACC
		ACCUGAGAAAGAAGCUGGUCGACAGCACAGACA
		AGGCAGACCUGAGACUGAUCUACCUGGCACUGG
		CACACAUGAUCAAGUUCAGAGGACACUUCCUGA
		UCGAAGGAGACCUGAACCCGGACAACAGCGACG
		UCGACAAGCUGUUCAUCCAGCUGGUCCAGACAU
		ACAACCAGCUGUUCGAAGAAAACCCGAUCAACG
		CAAGCGGAGUCGACGCAAAGGCAAUCCUGAGCG
		CAAGACUGAGCAAGAGCAGAAGACUGGAAAACC
		UGAUCGCACAGCUGCCGGGAGAAAAGAAGAACG
		GACUGUUCGGAAACCUGAUCGCACUGAGCCUGG
		GACUGACACCGAACUUCAAGAGCAACUUCGACC
		UGGCAGAAGACGCAAAGCUGCAGCUGAGCAAGG
		ACACAUACGACGACGACCUGGACAACCUGCUGGC
		ACAGAUCGGAGACCAGUACGCAGACCUGUUCCU
		GGCAGCAAAGAACCUGAGCGACGCAAUCCUGCU
		GAGCGACAUCCUGAGAGUCAACACAGAAAUCAC
		AAAGGCACCGCUGAGCGCAAGCAUGAUCAAGAG
		AUACGACGAACACCACCAGGACCUGACACUGCUG

		AAGGCACUGGUCAGACAGCAGCUGCCGGAAAAG
		UACAAGGAAAUCUUCUUCGACCAGAGCAAGAAC
		GGAUACGCAGGAUACAUCGACGGAGGAGCAAGC
		CAGGAAGAAUUCUACAAGUUCAUCAAGCCGAUC
		CUGGAAAAGAUGGACGGAACAGAAGAACUGCUG
		GUCAAGCUGAACAGAGAAGACCUGCUGAGAAAG
		CAGAGAACAUUCGACAACGGAAGCAUCCCGCACC
		AGAUCCACCUGGGAGAACUGCACGCAAUCCUGA
		GAAGACAGGAAGACUUCUACCCGUUCCUGAAGG
		ACAACAGAGAAAAGAUCGAAAAGAUCCUGACAU
		UCAGAAUCCCGUACUACGUCGGACCGCUGGCAA
		GAGGAAACAGCAGAUUCGCAUGGAUGACAAGAA
		AGAGCGAAGAAACAAUCACACCGUGGAACUUCG
		AAGAAGUCGUCGACAAGGGAGCAAGCGCACAGA
		GCUUCAUCGAAAGAAUGACAAACUUCGACAAGA
		ACCUGCCGAACGAAAAGGUCCUGCCGAAGCACA
		GCCUGCUGUACGAAUACUUCACAGUCUACAACG
		AACUGACAAAGGUCAAGUACGUCACAGAAGGAA
		UGAGAAAGCCGGCAUUCCUGAGCGGAGAACAGA
		AGAAGGCAAUCGUCGACCUGCUGUUCAAGACAA
		ACAGAAAGGUCACAGUCAAGCAGCUGAAGGAAG
		ACUACUUCAAGAAGAUCGAAUGCUUCGACAGCG
		UCGAAAUCAGCGGAGUCGAAGACAGAUUCAACG
		CAAGCCUGGGAACAUACCACGACCUGCUGAAGA
		UCAUCAAGGACAAGGACUUCCUGGACAACGAAG
		AAAACGAAGACAUCCUGGAAGACAUCGUCCUGA
		CACUGACACUGUUCGAAGACAGAGAAAUGAUCG
		AAGAAAGACUGAAGACAUACGCACACCUGUUCG
		ACGACAAGGUCAUGAAGCAGCUGAAGAGAAGAA
		GAUACACAGGAUGGGGAAGACUGAGCAGAAAGC
		UGAUCAACGGAAUCAGAGACAAGCAGAGCGGAA
		AGACAAUCCUGGACUUCCUGAAGAGCGACGGAU
		UCGCAAACAGAAACUUCAUGCAGCUGAUCCACG
		ACGACAGCCUGACAUUCAAGGAAGACAUCCAGA
		AGGCACAGGUCAGCGGACAGGGAGACAGCCUGC

		ACGAACACAUCGCAAACCUGGCAGGAAGCCCGGC
		AAUCAAGAAGGGAAUCCUGCAGACAGUCAAGGU
		CGUCGACGAACUGGUCAAGGUCAUGGGAAGACA
		CAAGCCGGAAAACAUCGUCAUCGAAAUGGCAAG
		AGAAAACCAGACAACACAGAAGGGACAGAAGAA
		CAGCAGAGAAAGAAUGAAGAGAAUCGAAGAAGG
		AAUCAAGGAACUGGGAAGCCAGAUCCUGAAGGA
		ACACCCGGUCGAAAACACACAGCUGCAGAACGA
		AAAGCUGUACCUGUACUACCUGCAGAACGGAAG
		AGACAUGUACGUCGACCAGGAACUGGACAUCAA
		CAGACUGAGCGACUACGACGUCGACCACAUCGUC
		CCGCAGAGCUUCCUGAAGGACGACAGCAUCGAC
		AACAAGGUCCUGACAAGAAGCGACAAGAACAGA
		GGAAAGAGCGACAACGUCCCGAGCGAAGAAGUC
		GUCAAGAAGAUGAAGAACUACUGGAGACAGCUG
		CUGAACGCAAAGCUGAUCACACAGAGAAAGUUC
		GACAACCUGACAAAGGCAGAGAGAGGAGGACUG
		AGCGAACUGGACAAGGCAGGAUUCAUCAAGAGA
		CAGCUGGUCGAAACAAGACAGAUCACAAAGCAC
		GUCGCACAGAUCCUGGACAGCAGAAUGAACACA
		AAGUACGACGAAAACGACAAGCUGAUCAGAGAA
		GUCAAGGUCAUCACACUGAAGAGCAAGCUGGUC
		AGCGACUUCAGAAAGGACUUCCAGUUCUACAAG
		GUCAGAGAAAUCAACAACUACCACCACGCACACG
		ACGCAUACCUGAACGCAGUCGUCGGAACAGCAC
		UGAUCAAGAAGUACCCGAAGCUGGAAAGCGAAU
		UCGUCUACGGAGACUACAAGGUCUACGACGUCA
		GAAAGAUGAUCGCAAAGAGCGAACAGGAAAUCG
		GAAAGGCAACAGCAAAGUACUUCUUCUACAGCA
		ACAUCAUGAACUUCUUCAAGACAGAAAUCACAC
		UGGCAAACGGAGAAAUCAGAAAGAGACCGCUGA
		UCGAAACAAACGGAGAAACAGGAGAAAUCGUCU
		GGGACAAGGGAAGAGACUUCGCAACAGUCAGAA
		AGGUCCUGAGCAUGCCGCAGGUCAACAUCGUCA
		AGAAGACAGAAGUCCAGACAGGAGGAUUCAGCA

		AGGAAAGCAUCCUGCCGAAGAGAAACAGCGACA
		AGCUGAUCGCAAGAAAGAAGGACUGGGACCCGA
		AGAAGUACGGAGGAUUCGACAGCCCGACAGUCG
		CAUACAGCGUCCUGGUCGUCGCAAAGGUCGAAA
		AGGGAAAGAGCAAGAAGCUGAAGAGCGUCAAGG
		AACUGCUGGGAAUCACAAUCAUGGAAAGAAGCA
		GCUUCGAAAAGAACCCGAUCGACUUCCUGGAAG
		CAAAGGGAUACAAGGAAGUCAAGAAGGACCUGA
		UCAUCAAGCUGCCGAAGUACAGCCUGUUCGAAC
		UGGAAAACGGAAGAAAGAGAAUGCUGGCAAGCG
		CAGGAGAACUGCAGAAGGGAAACGAACUGGCAC
		UGCCGAGCAAGUACGUCAACUUCCUGUACCUGG
		CAAGCCACUACGAAAAGCUGAAGGGAAGCCCGG
		AAGACAACGAACAGAAGCAGCUGUUCGUCGAAC
		AGCACAAGCACUACCUGGACGAAAUCAUCGAAC
		AGAUCAGCGAAUUCAGCAAGAGAGUCAUCCUGG
		CAGACGCAAACCUGGACAAGGUCCUGAGCGCAU
		ACAACAAGCACAGAGACAAGCCGAUCAGAGAAC
		AGGCAGAAAACAUCAUCCACCUGUUCACACUGA
		CAAACCUGGGAGCACCGGCAGCAUUCAAGUACU
		UCGACACAACAAUCGACAGAAAGAGAUACACAA
		GCACAAAGGAAGUCCUGGACGCAACACUGAUCC
		ACCAGAGCAUCACAGGACUGUACGAAACAAGAA
		UCGAUCUGAGCCAGCUGGGAGGAGACAGCGGAG
		GAAGCACAAACCUGAGCGACAUCAUCGAAAAGG
		AAACAGGAAAGCAGCUGGUCAUCCAGGAAAGCA
		UCCUGAUGCUGCCGGAAGAAGUCGAAGAAGUCA
		UCGGAAACAAGCCGGAAAGCGACAUCCUGGUCC
		ACACAGCAUACGACGAAAGCACAGACGAAAACG
		UCAUGCUGCUGACAAGCGACGCACCGGAAUACA
		AGCCGUGGGCACUGGUCAUCCAGGACAGCAACG
		GAGAAAACAAGAUCAAGAUGCUGAGCGGAGGAA
		GCCCGAAGAAGAAGAGAAAGGUCUAAUAGUCUA
		GACAUCACAUUUAAAAGCAUCUCAGCCUACCAU
		GAGAAUAAGAGAAAGAAAAUGAAGAUCAAUAGC

		UUAUUCAUCUCUUUUUCUUUUUCGUUGGUGUAA AGCCAACACCCUGUCUAAAAAACAUAAAUUUCU UUAAUCAUUUUGCCUCUUUUCUCUGUGCUUCAA UUAAUAAAAAAUGGAAAGAACCUCGAGAAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGCGAAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAACCGAAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA U
мРНК, кодирующая UGI	975	GGGAGACCCAAGCUGGCUAGCUCCCGCAGUCGGC GUCCAGCGGCUCUGCUUGUUCGUGUGUGUGUCG UUGCAGGCCUUAUUCGGAUCCGCCACCAUGGGA CCGAAGAAGAAGAGAAAGGUCGGAGGAGGAAGC ACAAACCUGUCGGACAUCAUCGAAAAGGAAACA GGAAAGCAGCUGGUCAUCCAGGAAUCGAUCCUG AUGCUGCCGGAAGAAGUCGAAGAAGUCAUCGGA AACAAGCCGGAAUCGGACAUCCUGGUCCACACA GCAUACGACGAAUCGACAGACGAAAACGUCAUG CUGCUGACAUCGGACGCACCGGAAUACAAGCCG UGGGCACUGGUCAUCCAGGACUCGAACGGAGAA AACAAGAUCAAGAUGCUGUGAUAGUCUAGACAU CACAUUUAAAAGCAUCUCAGCCUACCAUGAGAA UAAGAGAAAGAAAAUGAAGAUCAAUAGCUUAUU CAUCUCUUUUUCUUUUUCGUUGGUGUAAAGCCA ACACCCUGUCUAAAAAACAUAAAUUUCUUUAAU CAUUUUGCCUCUUUUCUCUGUGCUUCAAUUAAU AAAAAAUGGAAAGAACCUCGAGUCUAG
Направляющий каркас	976	NNNNNNNNNNNNNNNNNNNGUUUUAGAGCUAG AAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAU CACGAAAGGGCACCGAGUCGGUGCU
Направляющий каркас	977	mN*mN*mN*NNNNNNNNNNNNNNNNNGUUUUAG AmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAA AAUAAGGCUAGUCCGUUAUCACGAAAGGGCACC GAGUCGGmUmGmC*mU
Направляющий 88-мерный каркас с	978	GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmC AAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmAm

модификацией		AmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmG*mU*mG*mC
Направляющий каркас с модификацией	979	GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
Направляющий каркас с модификацией	980	mN*mN*mN*NNNNNNNNNNNNNNNNNGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Сконструированная клетка, в которой снижена или устранена поверхностная экспрессия MHC класса II по сравнению с немодифицированной клеткой, содержащая генетическую модификацию в гене CIITA, где генетическая модификация включает по меньшей мере один нуклеотид сайта сплайсинга в пределах геномных координат chr16:10902171-10923242.

2. Сконструированная клетка по п. 1, отличающаяся тем, что генетическая модификация включает модификацию по меньшей мере одного нуклеотида акцепторного сайта сплайсинга, необязательно где один нуклеотид представляет собой A или G.

3. Сконструированная клетка по п. 1, отличающаяся тем, что генетическая модификация включает модификацию по меньшей мере одного нуклеотида донорного сайта сплайсинга, необязательно где один нуклеотид представляет собой G или T.

4. Сконструированная клетка по любому из пп. 1-3, отличающаяся тем, что генетическая модификация включает модификацию нуклеотида, граничащего с сайтом сплайсинга.

5. Сконструированная клетка по любому из пп. 1-4, отличающаяся тем, что генетическая модификация включает по меньшей мере 5, 6, 7, 8, 9 или 10 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат chr16:10902171-10923242.

6. Сконструированная клетка по любому из пп. 1-5, отличающаяся тем, что генетическая модификация содержит по меньшей мере одну замену C на T или по меньшей мере одну замену A на G в пределах геномных координат chr16:10902171-10923242.

7. Сконструированная клетка по любому из пп. 1-6, отличающаяся тем, что генетическая модификация содержит по меньшей мере один нуклеотид сайта сплайсинга в пределах геномных координат, выбранных из: chr16:10918504-10918524, chr16:10923218-10923238, chr16:10923219-10923239, chr16:10923221-10923241, chr16:10906485-10906505, chr16:10916359-10916379, chr16:10903873-10903893, chr16:10909172-10909192, chr16:10922153-10922173, chr16:10916450-10916470, chr16:10923222-10923242, chr16:10916449-10916469 и chr16:10923214-10923234.

8. Сконструированная клетка по любому из пп. 1-7, отличающаяся тем, что генетическая модификация содержит по меньшей мере один нуклеотид сайта сплайсинга в пределах геномных координат, выбранных из: chr16:10908132-10908152, chr16:10908131-10908151, chr16:10916456-10916476, chr16:10918504-10918524, chr16:10909022-10909042, chr16:10918512-10918532, chr16:10918511-10918531, chr16:10895742-10895762, chr16:10916362-10916382, chr16:10916455-10916475, chr16:10909172-10909192, chr16:10906492-10906512, chr16:10909006-10909026, chr16:10922478-10922498, chr16:10895747-10895767, chr16:10916348-10916368, chr16:10910186-10910206, chr16:10906481-10906501, chr16:10909007-10909027, chr16:10895410-10895430 и chr16:10908130-10908150.

9. Сконструированная клетка по любому из пп. 1-8, отличающаяся тем, что генетическая модификация содержит по меньшей мере один нуклеотид сайта сплайсинга в пределах геномных координат, выбранных из: chr16:10918504-10918524, chr16:10923218-10923238, chr16:10923219-10923239, chr16:10923221-10923241, chr16:10906486-10906506, chr16:10906485-10906505, chr16:10903873-10903893, chr16:10909172-10909192, chr16:10918423-10918443, chr16:10916362-10916382, chr16:10916450-10916470, chr16:10922153-10922173, chr16:10923222-10923242, chr16:10910176-10910196, chr16:10895742-10895762, chr16:10916449-10916469, chr16:10923214-10923234, chr16:10906492-10906512 и chr16:10906487-10906507.

10. Сконструированная клетка, в которой снижена или устранена поверхностная экспрессия MHC класса II по сравнению с немодифицированной клеткой, содержащая генетическую модификацию в гене CIITA, в которой генетическая модификация содержит индел, замену C на T или замену A на G в пределах геномных координат, выбранных из: chr16:10895410-10895430, chr16:10898649-10898669, chr16:10898658-10898678, chr16:10902171-10902191, chr16:10902173-10902193, chr16:10902174-10902194, chr16:10902179-10902199, chr16:10902183-10902203, chr16:10902184-10902204, chr16:10902644-10902664, chr16:10902779-10902799, chr16:10902788-10902808, chr16:10902789-10902809, chr16:10902790-10902810, chr16:10902795-10902815, chr16:10902799-10902819, chr16:10903708-10903728, chr16:10903713-10903733, chr16:10903718-10903738, chr16:10903721-10903741, chr16:10903723-10903743, chr16:10903724-10903744, chr16:10903873-10903893, chr16:10903878-10903898, chr16:10903905-10903925, chr16:10903906-10903926, chr16:10904736-10904756, chr16:10904790-10904810, chr16:10904811-10904831, chr16:10906481-10906501, chr16:10906485-10906505, chr16:10906486-10906506, chr16:10906487-10906507, chr16:10906492-10906512, chr16:10908127-10908147, chr16:10908130-10908150, chr16:10908131-10908151, chr16:10908132-10908152, chr16:10908137-10908157, chr16:10908138-10908158, chr16:10908139-10908159, chr16:10909006-10909026, chr16:10909007-10909027, chr16:10909018-10909038, chr16:10909021-10909041, chr16:10909022-10909042, chr16:10909172-10909192, chr16:10910165-10910185, chr16:10910176-10910196, chr16:10910186-10910206, chr16:10915547-10915567, chr16:10915551-10915571, chr16:10915552-10915572, chr16:10915567-10915587, chr16:10916348-10916368, chr16:10916359-10916379, chr16:10916362-10916382, chr16:10916449-10916469, chr16:10916450-10916470, chr16:10916455-10916475, chr16:10916456-10916476, chr16:10918423-10918443, chr16:10918504-10918524, chr16:10918511-10918531, chr16:10918512-10918532, chr16:10918539-10918559, chr16:10922153-10922173, chr16:10922478-10922498, chr16:10922487-10922507, chr16:10922499-10922519, chr16:10923205-10923225, chr16:10923214-10923234, chr16:10923218-10923238, chr16:10923219-10923239, chr16:10923220-10923240, chr16:10923221-10923241 и chr16:10923222-10923242.

11. Сконструированная клетка по п. 10, отличающаяся тем, что генетическая модификация содержит по меньшей мере один нуклеотид сайта сплайсинга в пределах геномных координат, выбранных из: chr16:10918504-10918524, chr16:10923218-10923238, chr16:10923219-10923239, chr16:10923221-10923241, chr16:10906485-10906505, chr16:10916359-10916379, chr16:10903873-10903893, chr16:10909172-10909192, chr16:10922153-10922173, chr16:10916450-10916470, chr16:10923222-10923242, chr16:10916449-10916469 и chr16:10923214-10923234.

12. Сконструированная клетка по п. 10, отличающаяся тем, что генетическая модификация содержит по меньшей мере один нуклеотид сайта сплайсинга в пределах геномных координат, выбранных из: chr16:10908132-10908152, chr16:10908131-10908151, chr16:10916456-10916476, chr16:10918504-10918524, chr16:10909022-10909042, chr16:10918512-10918532, chr16:10918511-10918531, chr16:10895742-10895762, chr16:10916362-10916382, chr16:10916455-10916475, chr16:10909172-10909192, chr16:10906492-10906512, chr16:10909006-10909026, chr16:10922478-10922498, chr16:10895747-10895767, chr16:10916348-10916368, chr16:10910186-10910206, chr16:10906481-10906501, chr16:10909007-10909027, chr16:10895410-10895430 и chr16:10908130-10908150.

13. Сконструированная клетка по п. 10, отличающаяся тем, что генетическая модификация содержит по меньшей мере один нуклеотид сайта сплайсинга в пределах геномных координат, выбранных из: chr16:10918504-10918524, chr16:10923218-10923238, chr16:10923219-10923239, chr16:10923221-10923241, chr16:10906486-10906506, chr16:10906485-10906505, chr16:10903873-10903893, chr16:10909172-10909192, chr16:10918423-10918443, chr16:10916362-10916382, chr16:10916450-10916470, chr16:10922153-10922173, chr16:10923222-10923242, chr16:10910176-10910196, chr16:10895742-10895762, chr16:10916449-10916469, chr16:10923214-10923234, chr16:10906492-10906512 и chr16:10906487-10906507.

14. Сконструированная клетка по любому из пп. 10-13, отличающаяся тем, что генетическая модификация включает по меньшей мере 5, 6, 7, 8, 9 или 10 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат.

15. Сконструированная клетка по любому из пп. 10-14, отличающаяся тем, что генетическая модификация содержит по меньшей мере одну замену C на T или по меньшей мере одну замену A на G в пределах геномных координат.

16. Сконструированная клетка по любому из пп. 1-15, отличающаяся тем, что экспрессия MHC класса II снижена или устранена с помощью системы редактирования генов, которая связывается с геномной целевой последовательностью CIITA, содержащей по меньшей мере 5 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат, выбранных из: chr16:10895410-10895430, chr16:10898649-10898669, chr16:10898658-10898678, chr16:10902171-10902191, chr16:10902173-10902193, chr16:10902174-10902194, chr16:10902179-10902199, chr16:10902183-10902203, chr16:10902184-10902204, chr16:10902644-10902664, chr16:10902779-10902799, chr16:10902788-10902808,

chr16:10902789-10902809, chr16:10902790-10902810, chr16:10902795-10902815, chr16:10902799-10902819, chr16:10903708-10903728, chr16:10903713-10903733, chr16:10903718-10903738, chr16:10903721-10903741, chr16:10903723-10903743, chr16:10903724-10903744, chr16:10903873-10903893, chr16:10903878-10903898, chr16:10903905-10903925, chr16:10903906-10903926, chr16:10904736-10904756, chr16:10904790-10904810, chr16:10904811-10904831, chr16:10906481-10906501, chr16:10906485-10906505, chr16:10906486-10906506, chr16:10906487-10906507, chr16:10906492-10906512, chr16:10908127-10908147, chr16:10908130-10908150, chr16:10908131-10908151, chr16:10908132-10908152, chr16:10908137-10908157, chr16:10908138-10908158, chr16:10908139-10908159, chr16:10909006-10909026, chr16:10909007-10909027, chr16:10909018-10909038, chr16:10909021-10909041, chr16:10909022-10909042, chr16:10909172-10909192, chr16:10910165-10910185, chr16:10910176-10910196, chr16:10910186-10910206, chr16:10915547-10915567, chr16:10915551-10915571, chr16:10915552-10915572, chr16:10915567-10915587, chr16:10916348-10916368, chr16:10916359-10916379, chr16:10916362-10916382, chr16:10916449-10916469, chr16:10916450-10916470, chr16:10916455-10916475, chr16:10916456-10916476, chr16:10918423-10918443, chr16:10918504-10918524, chr16:10918511-10918531, chr16:10918512-10918532, chr16:10918539-10918559, chr16:10922153-10922173, chr16:10922478-10922498, chr16:10922487-10922507, chr16:10922499-10922519, chr16:10923205-10923225, chr16:10923214-10923234, chr16:10923218-10923238, chr16:10923219-10923239, chr16:10923220-10923240, chr16:10923221-10923241 и chr16:10923222-10923242.

17. Сконструированная клетка по любому из пп. 1-16, отличающаяся тем, что экспрессия MHC класса II снижена или устранена с помощью системы редактирования генов, которая связывается с геномной целевой последовательностью CIITA, содержащей по меньшей мере 5 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат, выбранных из: chr16:10903873-10903893, chr16:10903878-10903898, chr16:10903905-10903925, chr16:10903906-10903926, chr16:10904736-10904756, chr16:10904790-10904810, chr16:10904811-10904831, chr16:10906481-10906501, chr16:10906485-10906505, chr16:10906486-10906506, chr16:10906487-10906507, chr16:10906492-10906512, chr16:10908127-10908147, chr16:10908130-10908150, chr16:10908131-10908151, chr16:10908132-10908152, chr16:10908137-10908157, chr16:10908138-10908158, chr16:10908139-10908159, chr16:10909006-10909026, chr16:10909007-10909027, chr16:10909018-10909038, chr16:10909021-10909041, chr16:10909022-10909042, chr16:10909172-10909192, chr16:10910165-10910185, chr16:10910176-10910196, chr16:10910186-10910206, chr16:10915547-10915567, chr16:10915551-10915571, chr16:10915552-10915572, chr16:10915567-10915587, chr16:10916348-10916368, chr16:10916359-10916379, chr16:10916362-10916382, chr16:10916449-10916469, chr16:10916450-10916470, chr16:10916455-10916475, chr16:10916456-10916476, chr16:10918423-10918443, chr16:10918504-10918524, chr16:10918511-10918531,

chr16:10918512-10918532, chr16:10918539-10918559, chr16:10922153-10922173, chr16:10922478-10922498, chr16:10922487-10922507, chr16:10922499-10922519, chr16:10923205-10923225, chr16:10923214-10923234, chr16:10923218-10923238, chr16:10923219-10923239, chr16:10923220-10923240, chr16:10923221-10923241 и chr16:10923222-10923242.

18. Сконструированная клетка по любому из пп. 1-17, отличающаяся тем, что экспрессия MHC класса II снижена или устранена с помощью системы редактирования генов, которая связывается с геномной целевой последовательностью CIITA, содержащей по меньшей мере 5 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат, выбранных из: chr16:10906485-10906505, chr16:10906486-10906506, chr16:10906487-10906507, chr16:10906492-10906512, chr16:10908127-10908147, chr16:10908130-10908150, chr16:10908131-10908151, chr16:10908132-10908152, chr16:10908137-10908157, chr16:10908138-10908158, chr16:10908139-10908159, chr16:10909006-10909026, chr16:10909007-10909027, chr16:10909018-10909038, chr16:10909021-10909041, chr16:10909022-10909042, chr16:10909172-10909192, chr16:10910165-10910185, chr16:10910176-10910196, chr16:10910186-10910206, chr16:10915547-10915567, chr16:10915551-10915571, chr16:10915552-10915572, chr16:10915567-10915587, chr16:10916348-10916368, chr16:10916359-10916379, chr16:10916362-10916382, chr16:10916449-10916469, chr16:10916450-10916470, chr16:10916455-10916475, chr16:10916456-10916476, chr16:10918423-10918443, chr16:10918504-10918524, chr16:10918511-10918531, chr16:10918512-10918532, chr16:10918539-10918559, chr16:10922153-10922173, chr16:10922478-10922498, chr16:10922487-10922507, chr16:10922499-10922519, chr16:10923205-10923225, chr16:10923214-10923234, chr16:10923218-10923238, chr16:10923219-10923239, chr16:10923220-10923240, chr16:10923221-10923241 и chr16:10923222-10923242.

19. Сконструированная клетка по любому из пп. 1-18, отличающаяся тем, что экспрессия MHC класса II снижена или устранена с помощью системы редактирования генов, которая связывается с геномной целевой последовательностью CIITA, содержащей по меньшей мере 5 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат, выбранных из: chr16:10908130-10908150, chr16:10908131-10908151, chr16:10908132-10908152, chr16:10908137-10908157, chr16:10908138-10908158, chr16:10908139-10908159, chr16:10909006-10909026, chr16:10909007-10909027, chr16:10909018-10909038, chr16:10909021-10909041, chr16:10909022-10909042, chr16:10909172-10909192, chr16:10910165-10910185, chr16:10910176-10910196, chr16:10910186-10910206, chr16:10915547-10915567, chr16:10915551-10915571, chr16:10915552-10915572, chr16:10915567-10915587, chr16:10916348-10916368, chr16:10916359-10916379, chr16:10916362-10916382, chr16:10916449-10916469, chr16:10916450-10916470, chr16:10916455-10916475, chr16:10916456-10916476, chr16:10918423-10918443, chr16:10918504-10918524, chr16:10918511-10918531, chr16:10918512-10918532, chr16:10918539-10918559, chr16:10922153-10922173, chr16:10922478-10922498,

chr16:10922487-10922507, chr16:10922499-10922519, chr16:10923205-10923225, chr16:10923214-10923234, chr16:10923218-10923238, chr16:10923219-10923239, chr16:10923220-10923240, chr16:10923221-10923241 и chr16:10923222-10923242.

20. Сконструированная клетка по любому из пп. 1-19, отличающаяся тем, что экспрессия MHC класса II снижена или устранена с помощью системы редактирования генов, которая связывается с геномной целевой последовательностью CIITA, содержащей по меньшей мере 5 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат, выбранных из: chr16:10908132-10908152, chr16:10908131-10908151, chr16:10916456-10916476, chr16:10918504-10918524, chr16:10909022-10909042, chr16:10918512-10918532, chr16:10918511-10918531, chr16:10895742-10895762, chr16:10916362-10916382, chr16:10916455-10916475, chr16:10909172-10909192, chr16:10906492-10906512, chr16:10909006-10909026, chr16:10922478-10922498, chr16:10895747-10895767, chr16:10916348-10916368, chr16:10910186-10910206, chr16:10906481-10906501, chr16:10909007-10909027, chr16:10895410-10895430 и chr16:10908130-10908150.

21. Сконструированная клетка по любому из пп. 1-20, отличающаяся тем, что экспрессия MHC класса II снижена или устранена с помощью системы редактирования генов, которая связывается с геномной целевой последовательностью CIITA, содержащей по меньшей мере 5 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат, выбранных из: chr16:10908132-10908152, chr16:10908131-10908151, chr16:10916456-10916476, chr16:10918504-10918524, chr16:10909022-10909042, chr16:10918512-10918532, chr16:10918511-10918531, chr16:10895742-10895762, chr16:10916362-10916382, chr16:10916455-10916475, chr16:10909172-10909192, chr16:10906492-10906512, chr16:10909006-10909026 и chr16:10922478-10922498.

22. Сконструированная клетка по любому из пп. 1-21, отличающаяся тем, что экспрессия MHC класса II снижена или устранена с помощью системы редактирования генов, которая связывается с геномной целевой последовательностью CIITA, содержащей по меньшей мере 5 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат, выбранных из: chr16:10918504-10918524, chr16:10923218-10923238, chr16:10923219-10923239, chr16:10923221-10923241, chr16:10906486-10906506, chr16:10906485-10906505, chr16:10903873-10903893, chr16:10909172-10909192, chr16:10918423-10918443, chr16:10916362-10916382, chr16:10916450-10916470, chr16:10922153-10922173, chr16:10923222-10923242, chr16:10910176-10910196, chr16:10895742-10895762, chr16:10916449-10916469, chr16:10923214-10923234, chr16:10906492-10906512 и chr16:10906487-10906507.

23. Сконструированная клетка по любому из пп. 1-22, отличающаяся тем, что экспрессия MHC класса II снижена или устранена с помощью системы редактирования генов, которая связывается с геномной целевой последовательностью CIITA, содержащей по меньшей мере 5 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат, выбранных из: chr16:10918504-10918524, chr16:10923218-10923238, chr16:10923219-10923239, chr16:10923221-10923241, chr16:10906485-10906505, chr16:10916359-10916379,

chr16:10903873-10903893, chr16:10909172-10909192, chr16:10922153-10922173, chr16:10916450-10916470, chr16:10923222-10923242, chr16:10916449-10916469 и chr16:10923214-10923234.

24. Сконструированная клетка по любому из пп. 16-23, отличающаяся тем, что геномная целевая последовательность CIITA содержит по меньшей мере 10 или по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат.

25. Сконструированная клетка по любому из пп. 16-24, отличающаяся тем, что система редактирования генов содержит РНК-направляемый ДНК-связывающий агент.

26. Сконструированная клетка по любому из пп. 1-25, отличающаяся тем, что сконструированная клетка дополнительно имеет сниженную или устраненную поверхностную экспрессию MHC класса I.

27. Сконструированная клетка по любому из пп. 1-26, отличающаяся тем, что содержит генетическую модификацию гена бета-2-микроглобулина (B2M).

28. Сконструированная клетка по любому из пп. 1-27, отличающаяся тем, что содержит генетическую модификацию гена HLA-A.

29. Сконструированная клетка по любому из пп. 1-28, отличающаяся тем, что содержит экзогенную нуклеиновую кислоту, кодирующую нацеливающий рецептор, который экспрессируется на поверхности сконструированной клетки.

30. Сконструированная клетка по п. 29, отличающаяся тем, что нацеливающий рецептор представляет собой CAR, Т-клеточный рецептор (TKP) или TKP WT1.

31. Сконструированная клетка по любому из пп. 1-30, отличающаяся тем, что дополнительно содержит экзогенную нуклеиновую кислоту, кодирующую полипептид, который секретируется сконструированной клеткой.

32. Сконструированная клетка по любому из пп. 1-31, отличающаяся тем, что представляет собой Т-клетку и дополнительно имеет сниженную или устраненную экспрессию белка эндогенного Т-клеточного рецептора (TKP) по сравнению с немодифицированной клеткой.

33. Сконструированная клетка по п. 32, отличающаяся тем, что имеет сниженную или устраненную экспрессию белка TRAC или белка TRBC по сравнению с немодифицированной клеткой.

34. Фармацевтическая композиция, содержащая сконструированную клетку по любому из пп. 1-33.

35. Популяция клеток, содержащая сконструированную клетку по любому из пп. 1-33.

36. Фармацевтическая композиция, содержащая популяцию клеток, отличающаяся тем, что популяция клеток включает сконструированную клетку по любому из пп. 1-33.

37. Популяция клеток по п. 35 или фармацевтическая композиция по п. 34 или 36, отличающиеся тем, что популяция клеток по меньшей мере на 65%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 92%, по

меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94% или по меньшей мере на 95% является отрицательной по МНС класса II, как измерено с помощью проточной цитометрии.

38. Популяция клеток или фармацевтическая композиция по любому из пп. 34-37, отличающиеся тем, что популяция клеток по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% является отрицательной по эндогенному белку ТКР, как измерено с помощью проточной цитометрии.

39. Способ введения сконструированной клетки, популяции клеток или фармацевтической композиции по любому из пп. 1-38 субъекту, нуждающемуся в этом.

40. Способ введения сконструированной клетки, популяции клеток или фармацевтической композиции по любому из пп. 1-39 субъекту в качестве терапии на основе адоптивного переноса клеток (АПК).

41. Композиция, содержащая:

CIITA-направленную РНК, содержащую направляющую последовательность, которая

нацелена на геномную целевую последовательность CIITA, которая содержит по меньшей мере один нуклеотид сайта сплайсинга, или

направляет РНК-направляемый ДНК-связывающий агент для создания разреза в геномной целевой последовательности CIITA, которая находится на расстоянии 5 нуклеотидов или менее от нуклеотида, граничащего с сайтом сплайсинга;

где CIITA-направленная РНК нацелена на геномную целевую последовательность CIITA, содержащую по меньшей мере 10 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат chr16:10902171-10923242.

42. Композиция, содержащая:

CIITA-направленную РНК (нРНК), содержащую

направляющую последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1-101; или

или по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 1-101; или

направляющую последовательность, по меньшей мере на 95%, 90% или 85% идентичную последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 1-101; или

последовательность, которая включает 10 смежных нуклеотидов ±10 нуклеотидов геномных координат, указанных в Таблице 1; или

по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов последовательности из (iv); или

направляющую последовательность, которая по меньшей мере на 95%, 90% или 85% идентична последовательности, выбранной из (v).

43. Композиция, содержащая:

CIITA-направленную РНК, которая представляет собой одиночную направляющую РНК (онРНК), содержащую

направляющую последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1-101; или

или по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 1-101; или

направляющую последовательность, по меньшей мере на 95%, 90% или 85% идентичную последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 1-101; или

последовательность, которая включает 10 смежных нуклеотидов ±10 нуклеотидов геномных координат, указанных в Таблице 1; или

по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов последовательности из (iv); или

направляющую последовательность, которая по меньшей мере на 95%, 90% или 85% идентична последовательности, выбранной из (v).

44. Композиция по любому из пп. 41-43, дополнительно содержащую РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, или нуклеиновую кислоту, кодирующую РНК-направляемый ДНК-связывающий агент.

45. Композиция по п. 44, отличающаяся тем, что РНК-направляемый ДНК-связывающий агент содержит дезаминазную область.

46. Композиция по п. 44, отличающаяся тем, что РНК-направляемый ДНК-связывающий агент содержит дезаминазу APOBEC3A (A3A) и РНК-направляемую никазу.

47. Композиция по п. 45 или 46, дополнительно содержащая ингибитор урацилгликозилазы (UGI).

48. Композиция по любому из пп. 45-47, отличающаяся тем, что РНК-направляемый ДНК-связывающий агент вызывает превращение цитозина (C) в тимин (T) в геномной целевой последовательности CIITA.

49. Композиция по любому из пп. 45-47, отличающаяся тем, что РНК-направляемый ДНК-связывающий агент вызывает превращение аденина (A) в гуанин (G) в геномной целевой последовательности CIITA.

50. Композиция по любому из пп. 41-47, отличающаяся тем, что CIITA-направленная РНК нацелена на геномную целевую последовательность CIITA, которая содержит по меньшей мере один нуклеотид акцепторного сайта сплайсинга или донорного сайта сплайсинга.

51. Композиция по п. 50, отличающаяся тем, что один нуклеотид представляет собой нуклеотид, граничащий с сайтом сплайсинга, в акцепторном сайте сплайсинга или нуклеотид, граничащий с сайтом сплайсинга, в донорном сайте сплайсинга.

52. Композиция по любому из пп. 41-51, отличающаяся тем, что CIITA-направленная РНК содержит направляющую последовательность, которая направляет РНК-направляемый ДНК-связывающий агент для создания разреза в геномной целевой последовательности CIITA, которая находится на расстоянии 4 нуклеотидов или менее, 3 нуклеотидов или менее, 2 нуклеотидов или менее или 1 нуклеотида от нуклеотида, граничащего с сайтом сплайсинга.

53. Композиция по любому из пп. 41-52, отличающаяся тем, что CIITA-направленная РНК содержит направляющую последовательность, которая направляет РНК-направляемый ДНК-связывающий агент сделать разрез в геномной целевой последовательности CIITA по нуклеотиду, граничащему с сайтом сплайсинга.

54. Способ получения сконструированной клетки, в которой снижена или устранена поверхностная экспрессия белка MHC класса II по сравнению с немодифицированной клеткой, включающий приведение клетки в контакт с композицией по любому из пп. 41-53.

55. Способ снижения поверхностной экспрессии белка MHC класса II в сконструированной клетке по сравнению с немодифицированной клеткой, включающий приведение клетки в контакт с композицией по любому из пп. 41-53.

56. Способ по п. 54 или 55, дополнительно включающий снижение или устранение поверхностной экспрессии белка MHC класса I в клетке по сравнению с немодифицированной клеткой.

57. Способ по любому из пп. 54-56, дополнительно включающий снижение или устранение поверхностной экспрессии белка B2M в клетке по сравнению с немодифицированной клеткой.

58. Способ по любому из пп. 54-57, дополнительно включающий снижение или устранение поверхностной экспрессии белка HLA-A в клетке по сравнению с немодифицированной клеткой.

59. Способ по любому из пп. 54-58, дополнительно включающий снижение или устранение поверхностной экспрессии белка TKP в клетке по сравнению с немодифицированной клеткой.

60. Способ по любому из пп. 54-59, дополнительно включающий приведение клетки в контакт с экзогенной нуклеиновой кислотой.

61. Способ по п. 60, дополнительно включающий приведение клетки в контакт с экзогенной нуклеиновой кислотой, кодирующей нацеливающий рецептор или полипептид, который секретируется клеткой.

62. Сконструированная клетка, популяция клеток, фармацевтическая композиция или способ по любому из пп. 1-61, включающие экзогенную нуклеиновую кислоту или приведение клетки в контакт с экзогенной нуклеиновой кислотой, где экзогенная нуклеиновая кислота кодирует молекулу ингибитора NK-клеток.

63. Сконструированная клетка, популяция клеток, фармацевтическая композиция или способ по любому из пп. 1-62, включающие экзогенную нуклеиновую кислоту или приведение клетки в контакт с экзогенной нуклеиновой кислотой, где экзогенная нуклеиновая кислота кодирует молекулу ингибитора NK-клеток, где молекула ингибитора NK-клетки связывается с ингибирующим рецептором на NK-клетке, молекула ингибитора NK-клетки связывается с NKG2A на NK-клетке, молекула ингибитора NK-клетки представляет собой неклассическую молекулу MHC класса I, молекула ингибитора NK-клетки представляет собой HLA-E, молекула ингибитора NK-клеток представляет собой

слитый белок, или молекула ингибитора NK-клетки представляет собой слитый белок, содержащий HLA-E и B2M.

64. Сконструированная клетка, популяция клеток, фармацевтическая композиция или способ по любому из пп. 1-63, включающие экзогенную нуклеиновую кислоту, кодирующую полипептид, который секретируется клеткой, или приведение клетки в контакт с указанной экзогенной нуклеиновой кислотой, где секретируемый полипептид представляет собой антитело или фрагмент антитела.

65. Сконструированная клетка, популяция клеток, фармацевтическая композиция или способ по любому из пп. 1-64, включающие экзогенную нуклеиновую кислоту, кодирующую полипептид, который секретируется клеткой, или приведение клетки в контакт с указанной экзогенной нуклеиновой кислотой, где секретируемый полипептид представляет собой полноразмерное антитело IgG, одноцепочечное антитело, нейтрализующее антитело.

66. Сконструированная клетка, популяция клеток, фармацевтическая композиция или способ по любому из пп. 1-65, включающие экзогенную нуклеиновую кислоту, кодирующую полипептид, который секретируется клеткой, или приведение клетки в контакт с указанной экзогенной нуклеиновой кислотой, где секретируемый полипептид представляет собой терапевтический полипептид.

67. Сконструированная клетка, популяция клеток, фармацевтическая композиция или способ по пп. 1-66, включающие экзогенную нуклеиновую кислоту, кодирующую полипептид, который секретируется клеткой, или приведение клетки в контакт с указанной экзогенной нуклеиновой кислотой, где секретируемый полипептид представляет собой фермент, цитокин или хемокин.

68. Сконструированная клетка, популяция клеток, фармацевтическая композиция или способ по любому из пп. 1-67, включающие экзогенную нуклеиновую кислоту, кодирующую нацеливающий рецептор, или приведение клетки в контакт с экзогенной нуклеиновой кислотой, кодирующей нацеливающий рецептор, где нацеливающий рецептор представляет собой Т-клеточный рецептор (TKP), TKP WT1 или CAR.

69. Сконструированная клетка, популяция клеток, фармацевтическая композиция или способ по любому из пп. 1-68, отличающиеся тем, что CIITA-направленная РНК, РНК-направляемый ДНК-связывающий агент для CIITA и/или экзогенная нуклеиновая кислота вводятся в клетку в векторе, необязательно, где CIITA-направленная РНК и РНК-направляемый ДНК-связывающий агент для CIITA содержатся в одном и том же векторе.

70. Сконструированная клетка, популяция клеток, фармацевтическая композиция или способ по п. 69, отличающиеся тем, что вектор представляет собой лентивирусный вектор.

71. Сконструированная клетка, популяция клеток, фармацевтическая композиция или способ по любому из п. 69, отличающиеся тем, что вектор представляет собой AAV.

72. Сконструированная клетка, популяция клеток, фармацевтическая композиция или способ по любому из пп. 1-71, отличающиеся тем, что направляющая РНК или

экзогенная нуклеиновая кислота вводятся в клетку в составной композиции липида и нуклеиновой кислоты, необязательно в той же составной композиции липида и нуклеиновой кислоты, что и РНК-направляемый ДНК-связывающий агент.

73. Сконструированная клетка, популяция клеток, фармацевтическая композиция или способ по п. 72, отличающиеся тем, что составная композиция липида и нуклеиновой кислоты представляет собой липидную наночастицу (ЛНЧ).

74. Сконструированная клетка, популяция клеток, композиция, фармацевтическая композиция или способ по любому из пп. 41-73, отличающиеся тем, что CIITA-направленная РНК содержит нуклеотидную последовательность, выбранную из: SEQ ID NO: 87, SEQ ID NO: 97, SEQ ID NO: 98, SEQ ID NO: 100, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 80, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 91, SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 101, SEQ ID NO: 82 и SEQ ID NO: 96.

75. Сконструированная клетка, популяция клеток, композиция, фармацевтическая композиция или способ по любому из пп. 41-74, отличающиеся тем, что CIITA-направленная РНК содержит по меньшей мере одну модификацию, где указанная по меньшей мере одна модификация включает (i) 2'-O-метил (2'-O-Me) модифицированный нуклеотид, (ii) фосфоротиоатную (ФТ) связь между нуклеотидами, (iii) 2'-фтор (2'-F) модифицированный нуклеотид, (iv) модификацию одного или нескольких из первых пяти нуклеотидов на 5'-конце направляющей РНК, (v) модификацию одного или нескольких из последних пяти нуклеотидов на 3'-конце направляющей РНК, (vi) ФТ-связь между первыми четырьмя нуклеотидами направляющей РНК, (vii) ФТ-связь между последними четырьмя нуклеотидами направляющей РНК, (viii) 2'-O-Me модифицированный нуклеотид в первых трех нуклеотидах на 5'-конце направляющей РНК, (ix) 2'-O-Me модифицированный нуклеотид в последних трех нуклеотидах на 3'-конце направляющей РНК, или комбинации одного или нескольких из (i)-(ix).

76. Сконструированная клетка или популяция клеток, содержащие генетическую модификацию, включающую индел в геномной области, на которую нацелена CIITA-направленная РНК по любому из пп. 41-75.

77. Сконструированная клетка или популяция клеток, содержащие генетическую модификацию, которая включает замену C на T или замену A на G в геномной области, на которую нацелена CIITA-направленная РНК по любому из пп. 41-75.

78. Сконструированная клетка, популяция клеток, композиция, фармацевтическая композиция или способ по любому из пп. 1-77 для применения для экспрессии ТКР со специфичностью к полипептиду, экспрессируемому раковыми клетками.

79. Сконструированная клетка, популяция клеток, композиция, фармацевтическая композиция или способ по любому из пп. 1-78 для применения при введении субъекту в качестве терапии на основе адоптивного переноса клеток (АПК).

80. Сконструированная клетка, популяция клеток, композиция, фармацевтическая композиция или способ по любому из пп. 1-79 для применения при лечении субъекта, больного раком, инфекционным заболеванием или аутоиммунным заболеванием.

81. Сконструированная клетка, популяция клеток, фармацевтическая композиция или способ по любому из пп. 1-80, отличающиеся тем, что генетическая модификация включает индел.

82. Сконструированная клетка, популяция клеток, фармацевтическая композиция или способ по любому из пп. 1-81, отличающиеся тем, что генетическая модификация включает замену C на T.

83. Сконструированная клетка, популяция клеток, фармацевтическая композиция или способ по любому из пп. 1-82, отличающиеся тем, что генетическая модификация включает замену A на G.

84. Сконструированная клетка, популяция клеток, фармацевтическая композиция или способ по любому из пп. 1-83, отличающиеся тем, что клетка является гомозиготной по HLA-B и гомозиготной по HLA-C.

85. Сконструированная клетка, популяция клеток, фармацевтическая композиция или способ по любому из пп. 1-84, отличающиеся тем, что клетка дополнительно содержит генетическую модификацию в гене HLA-A, где клетка является гомозиготной по HLA-B и гомозиготной по HLA-C, и где генетическая модификация в гене HLA-A включает по меньшей мере один нуклеотид в пределах геномных координат, выбранных из:

от chr6:29942854 до chr6:29942913 и

от chr6:29943518 до chr6: 29943619.

86. Сконструированная клетка, популяция клеток, фармацевтическая композиция или способ по любому из пп. 1-85, отличающиеся тем, что клетка дополнительно содержит генетическую модификацию в гене HLA-A, и где генетическая модификация в гене HLA-A включает по меньшей мере один нуклеотид в пределах геномных координат, выбранных из: от chr6:29942864 до chr6: 29942903 или от chr6:29943528 до chr6:29943609.

87. Способ получения сконструированной клетки, в которой снижена или устранена поверхностная экспрессия белка MHC класса II и белка HLA-A по сравнению с немодифицированной клеткой, включающий:

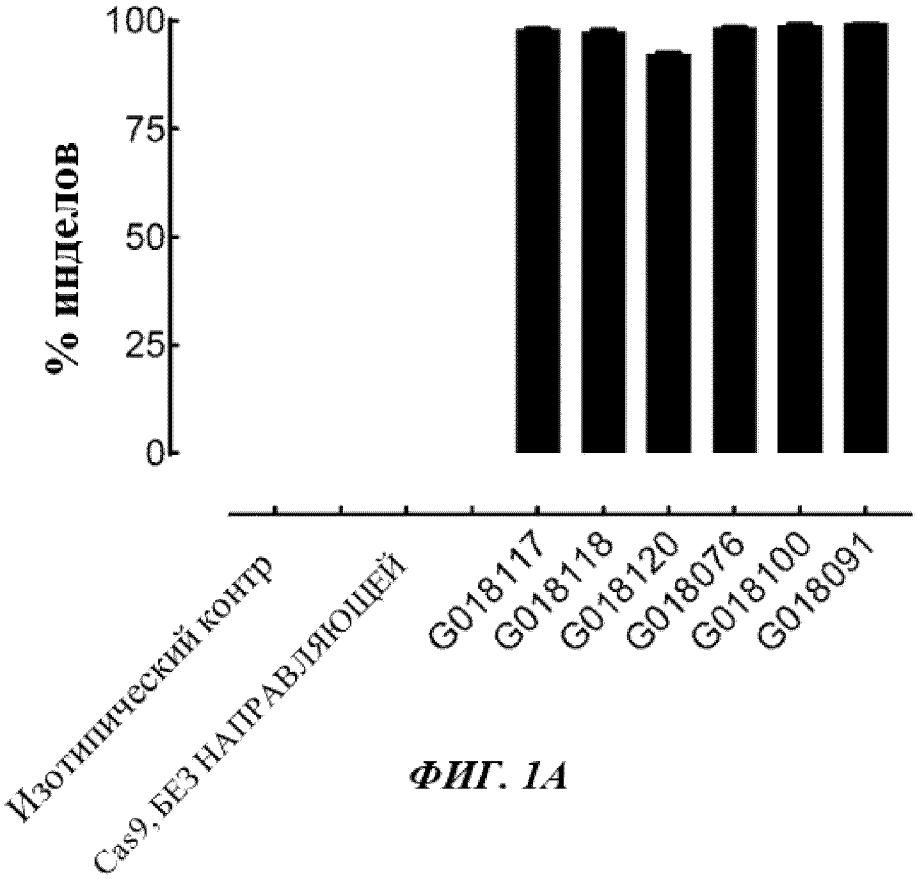
приведение клетки в контакт с CIITA-направленной РНК, где направляющая РНК содержит направляющую последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1-101;

приведение клетки в контакт с HLA-A-направленной РНК, где HLA-A-направленная РНК содержит направляющую последовательность, выбранную из любой из SEQ ID NO: 2001-2095; и

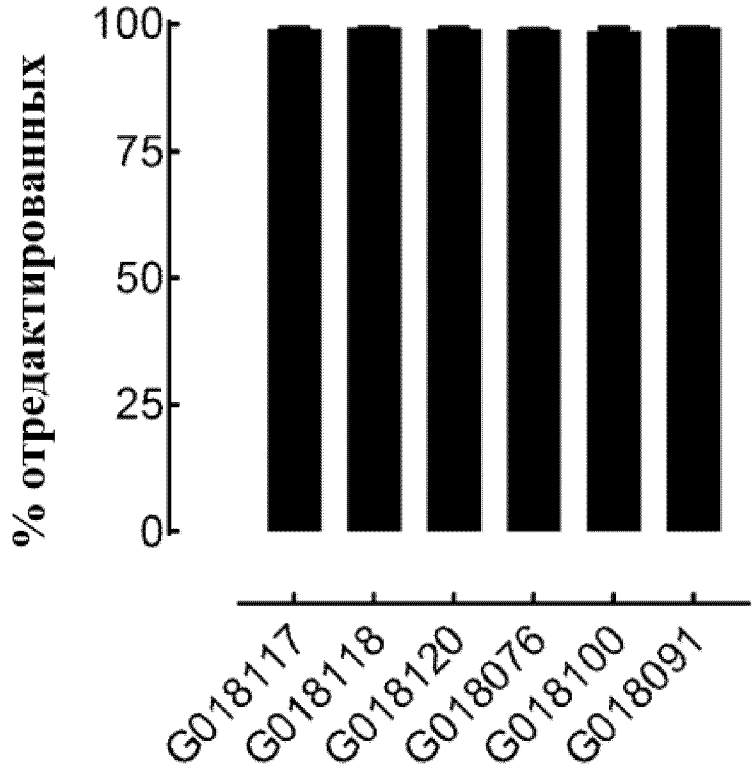
необязательно приведение клетки в контакт с РНК-направляемым ДНК-связывающим агентом или нуклеиновой кислотой, кодирующей РНК-направляемый ДНК-связывающий агент;

тем самым снижая или устраняя поверхностную экспрессию белка MHC класса II и белка HLA-A в клетке по сравнению с немодифицированной клеткой.

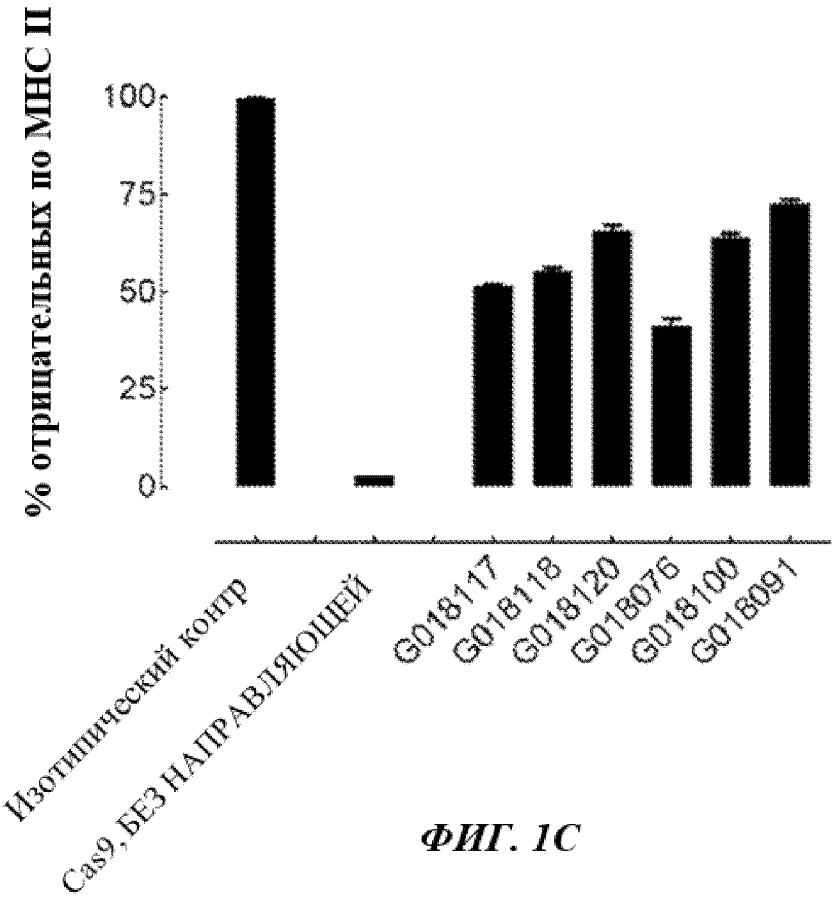
По доверенности


% индел
100
75
50
25
0
Изотипический контр
Cas9, БЕЗ НАПРАВЛЯЮЩЕЙ
G018117
G018118
G018120
G018076
G018100
G018091

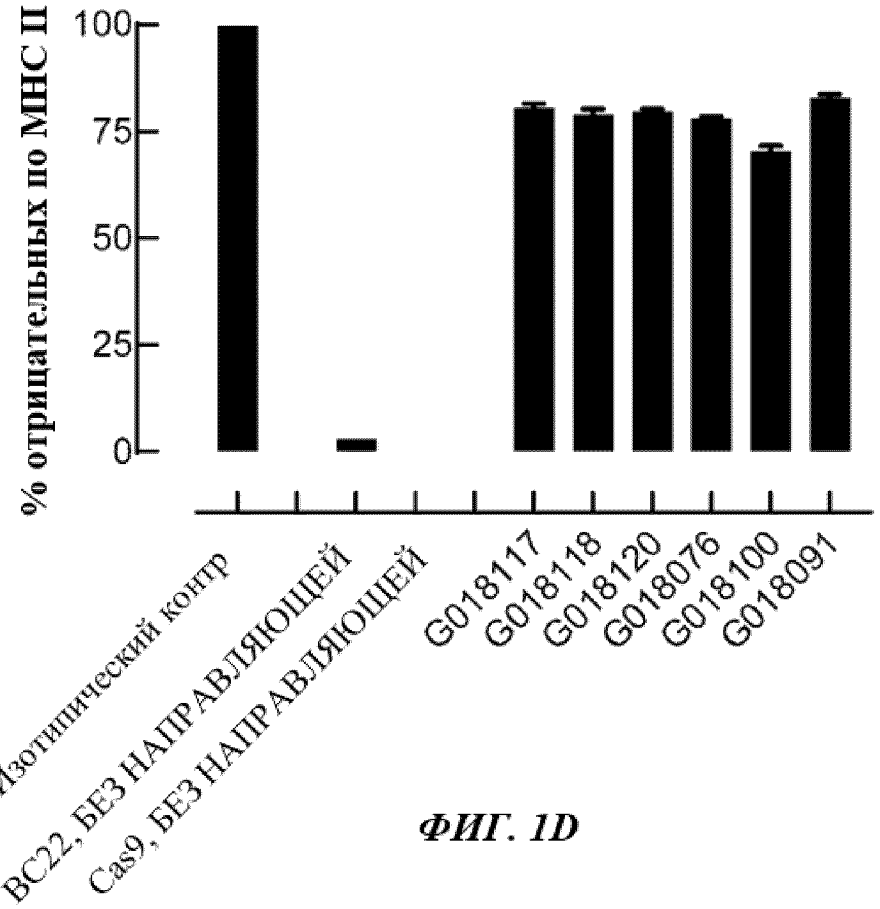
ФИГ. 1A


% отредактированных
100
75
50
25
0
G018117
G018118
G018120
G018076
G018100
G018091

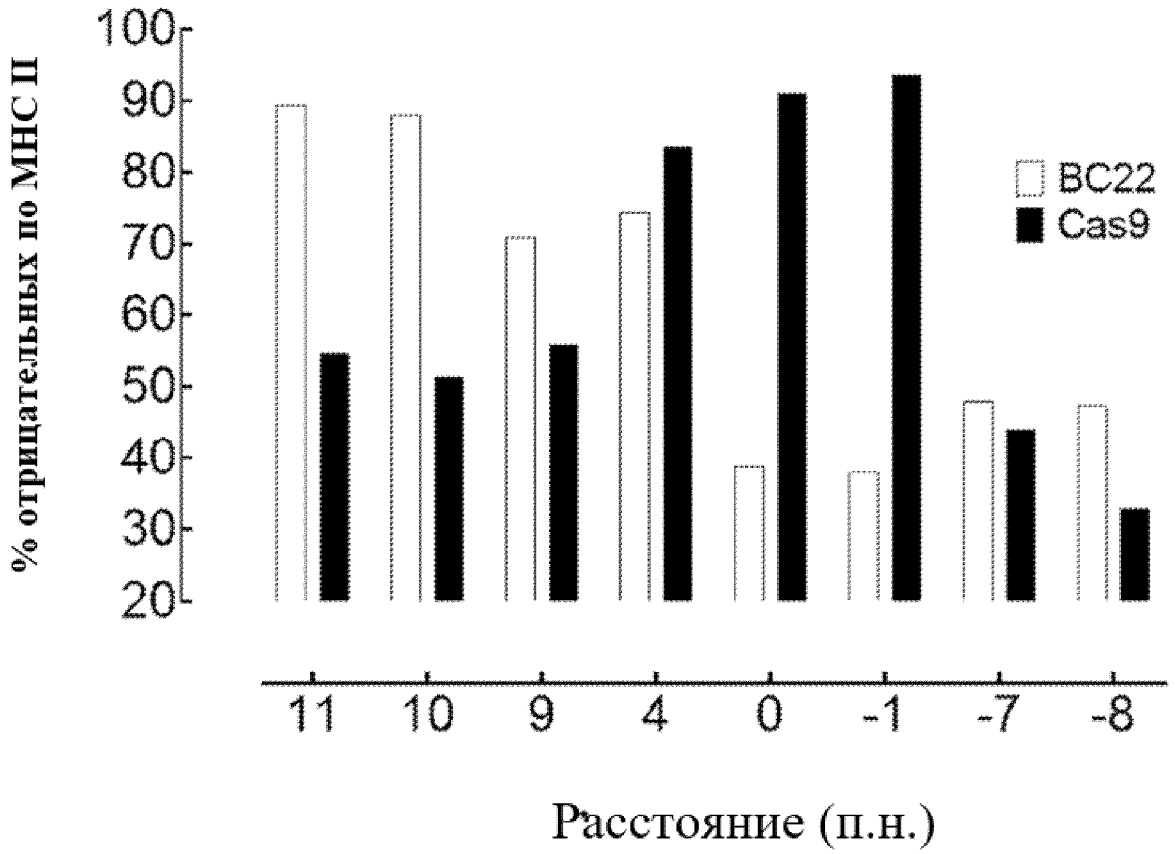
ФИГ. 1B


% отрицательных по МНС II
100
75
50
25
0
Изотипический контр
Cas9, БЕЗ НАПРАВЛЯЮЩЕЙ
G018117
G018118
G018120
G018076
G018100
G018091

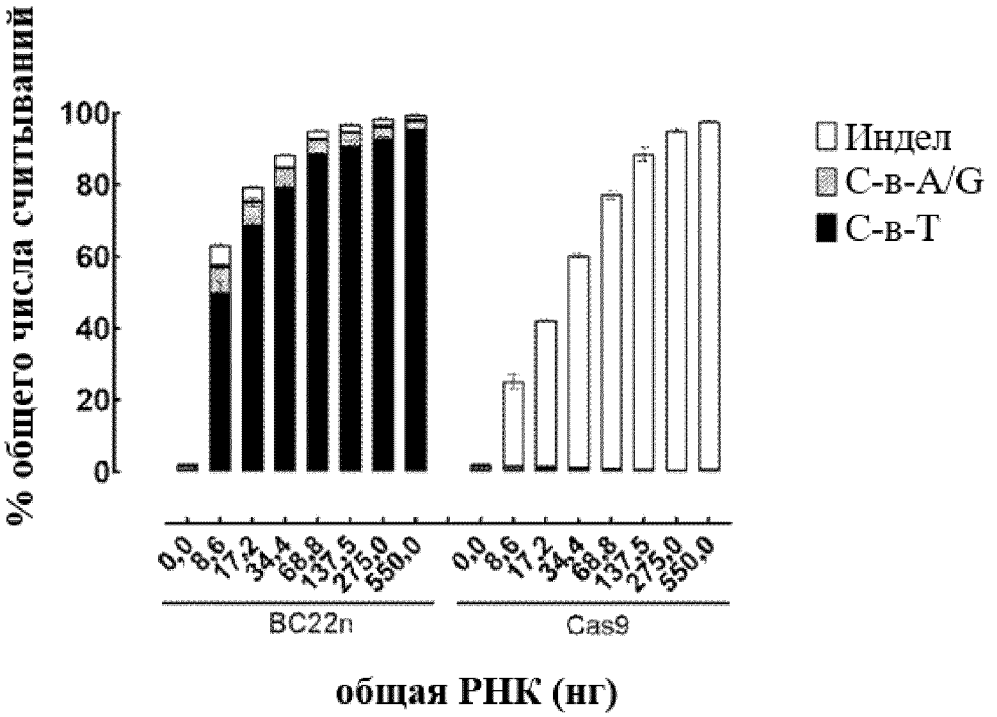
ФИГ. 1C


% отрицательных по МНС II
100
75
50
25
0
Изотипический контр
BC22, БЕЗ НАПРАВЛЯЮЩЕЙ
Cas9, БЕЗ НАПРАВЛЯЮЩЕЙ
G018117
G018118
G018120
G018076
G018100
G018091

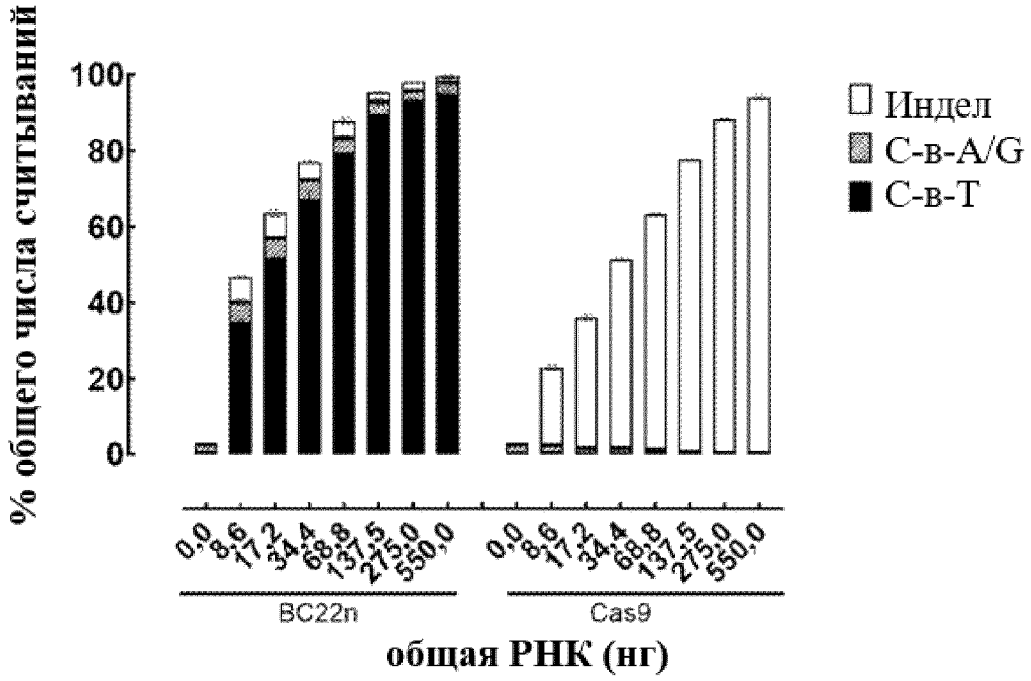
ФИГ. 1D


% отрицательных по МНС II
100
90
80
70
60
50
40
30
20
BC22
Cas9
11
10
9
4
0
-1
-7
-8
Расстояние (п.н.)

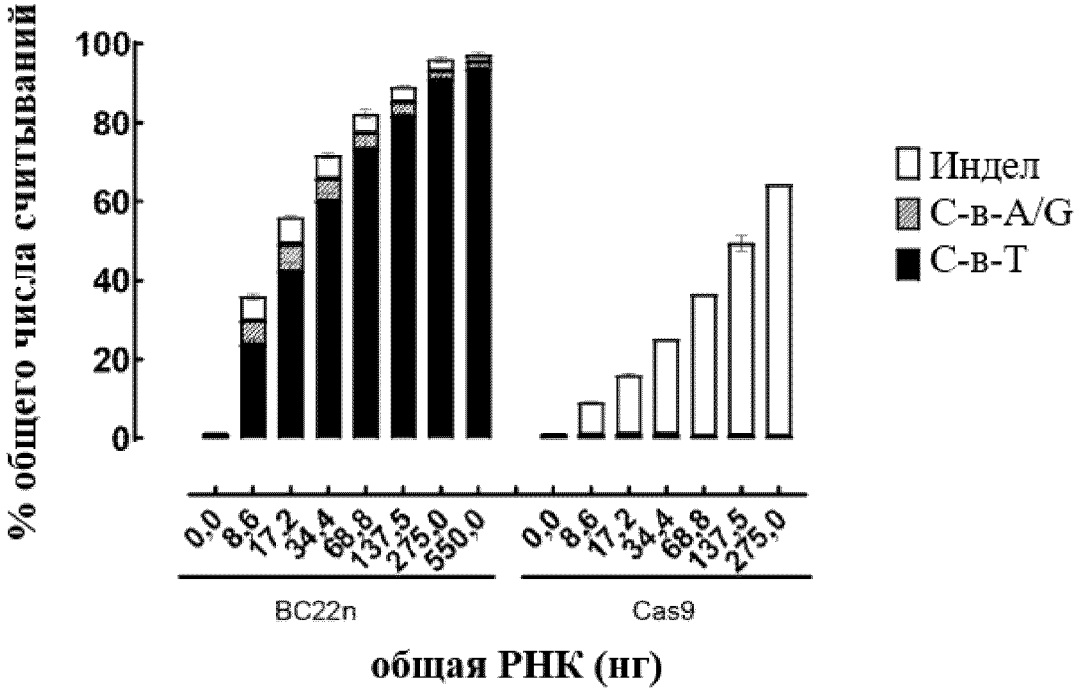
ФИГ. 2


% общего числа считываний
100
80
60
40
20
0
Индел
C-в-A/G
C-в-T
0,0
8,6
17,2
34,4
68,8
137,5
275,0
550,0
BC22n
Cas9
общая РНК (нг)

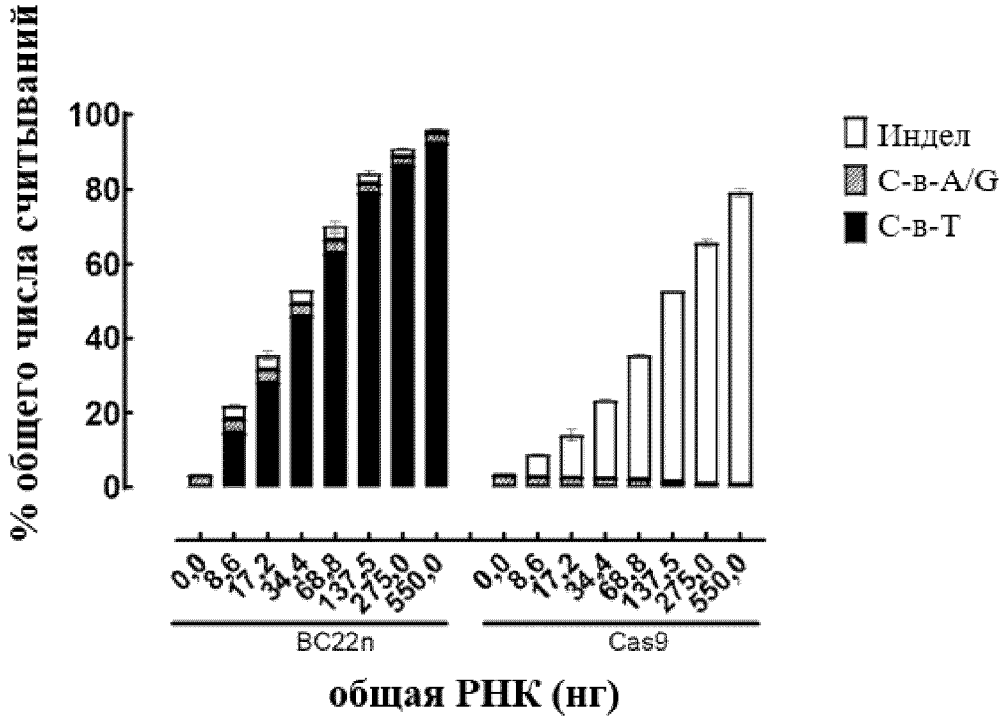
ФИГ. 3А


% общего числа считываний
100
80
60
40
20
0
Индел
C-в-A/G
C-в-T
0,0
8,6
17,2
34,4
68,8
137,5
275,0
550,0
BC22n
Cas9
общая РНК (нг)

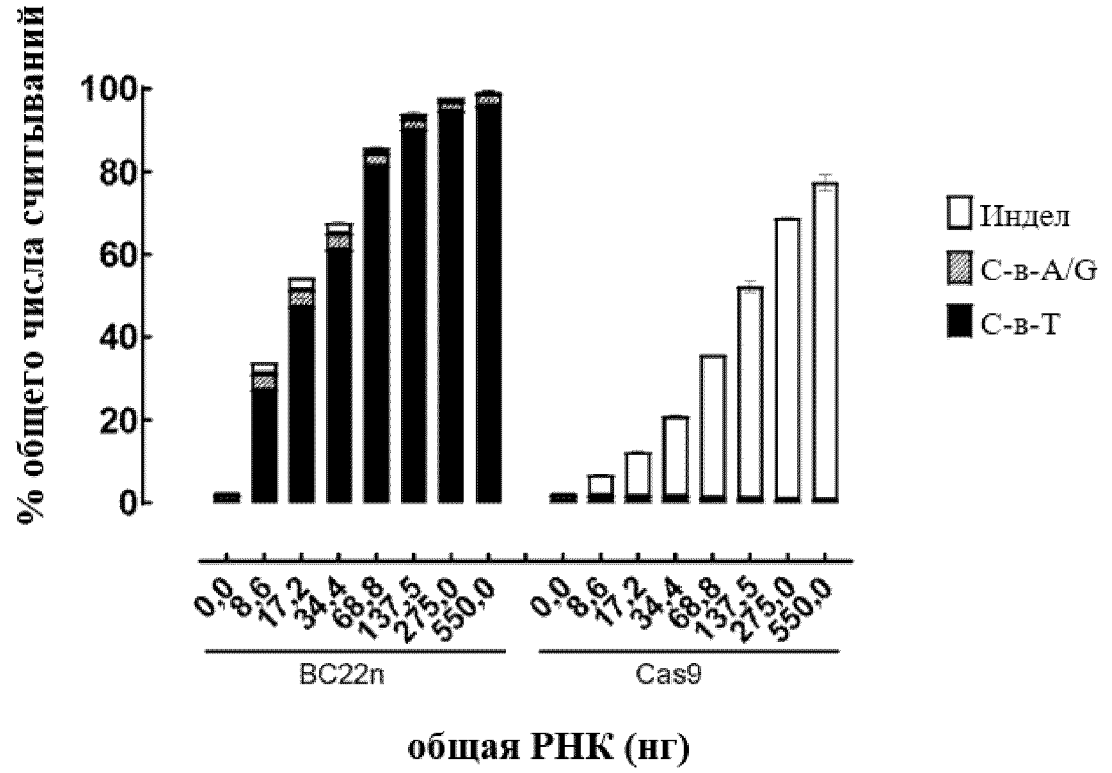
ФИГ. 3В


% общего числа считываний
100
80
60
40
20
0
Индел
C-в-A/G
C-в-T
0,0
8,6
17,2
34,4
68,8
137,5
275,0
550,0
BC22n
Cas9
общая РНК (нг)

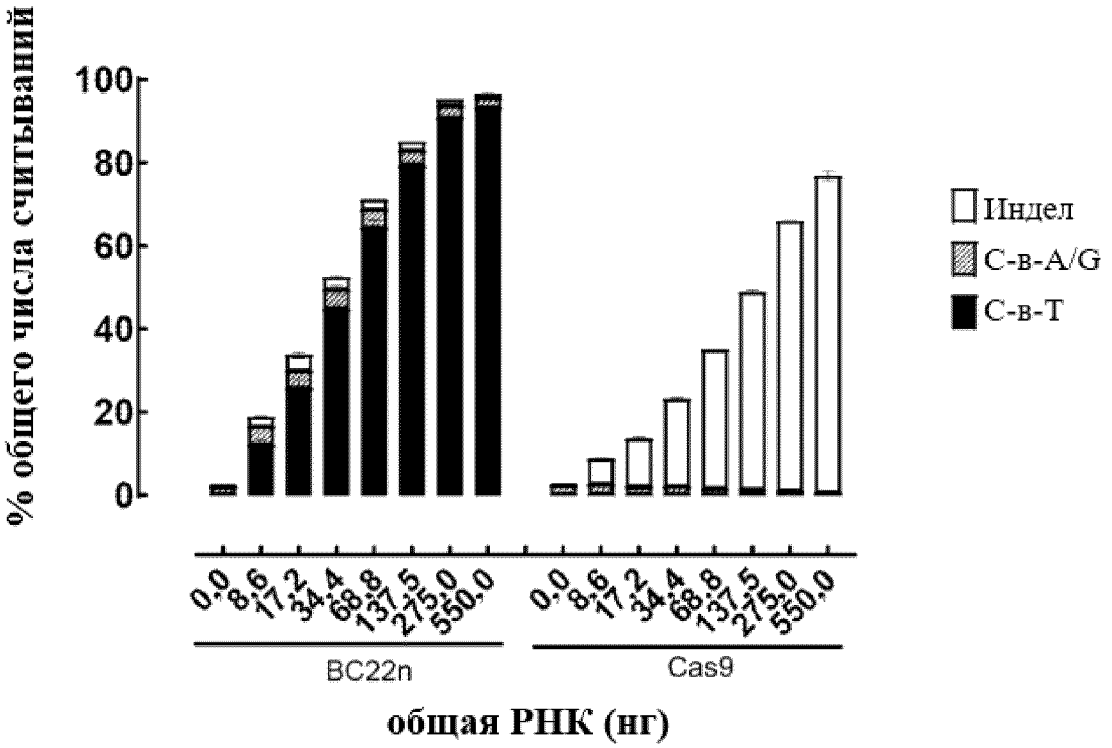
ФИГ. 3C


% общего числа считываний
100
80
60
40
20
0
Индел
C-в-A/G
C-в-T
0,0
8,6
17,2
34,4
68,8
137,5
275,0
550,0
BC22n
Cas9
общая РНК (нг)

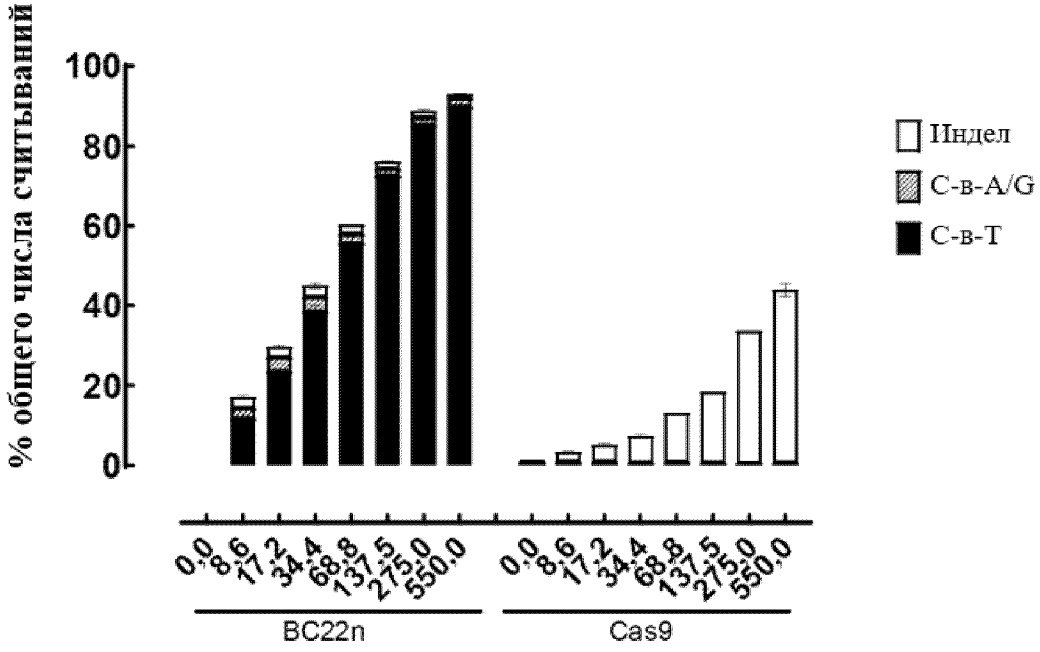
ФИГ. 3D


% общего числа считываний
100
80
60
40
20
0
Индел
C-в-A/G
C-в-T
0,0
8,6
17,2
34,4
68,8
137,5
275,0
550,0
BC22n
Cas9
общая РНК (нг)

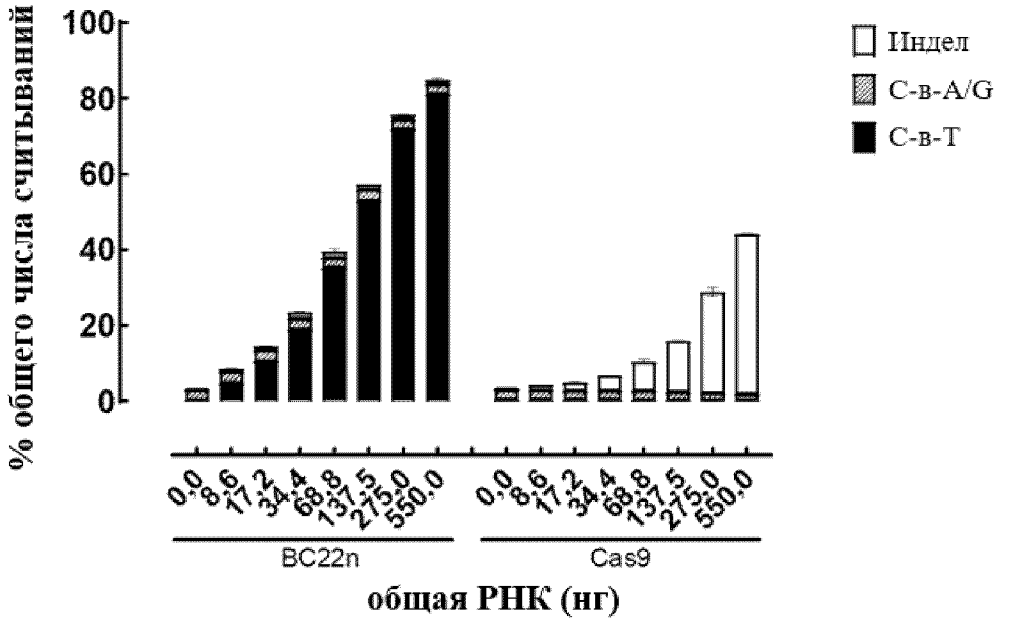
ФИГ. 4A


% общего числа считываний
100
80
60
40
20
0
Индел
C-в-A/G
C-в-T
0,0
8,6
17,2
34,4
68,8
137,5
275,0
550,0
BC22n
Cas9
общая РНК (нг)

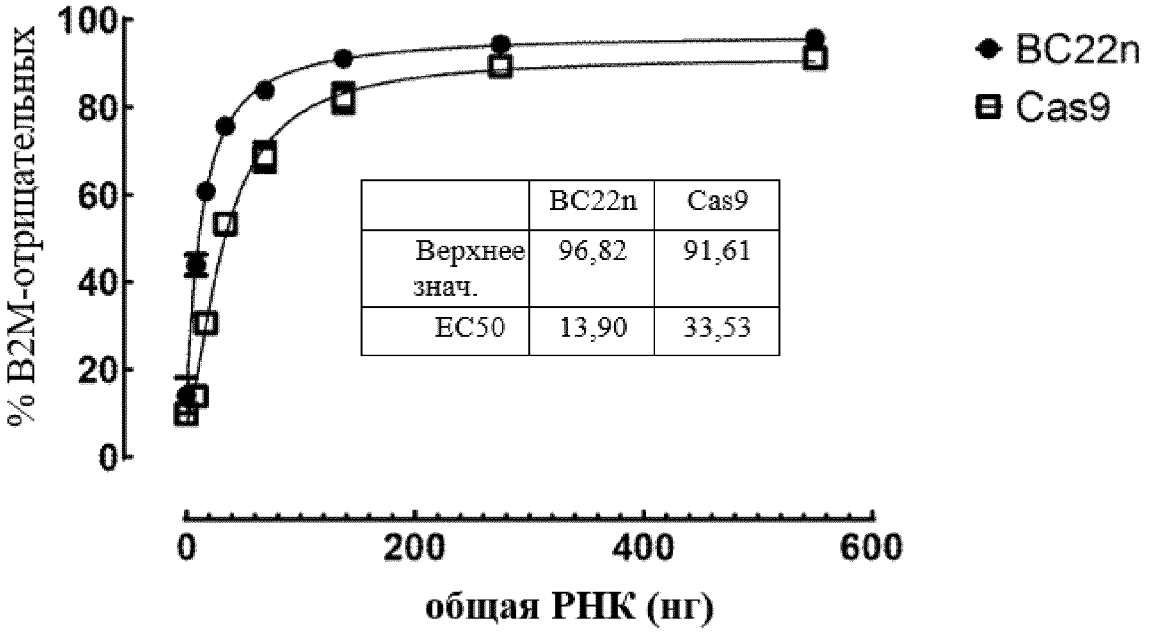
ФИГ. 4B


% общего числа считываний
100
80
60
40
20
0
Индел
C-в-A/G
C-в-T
0,0
8,6
17,2
34,4
68,8
137,5
275,0
550,0
BC22n
Cas9
общая РНК (нг)

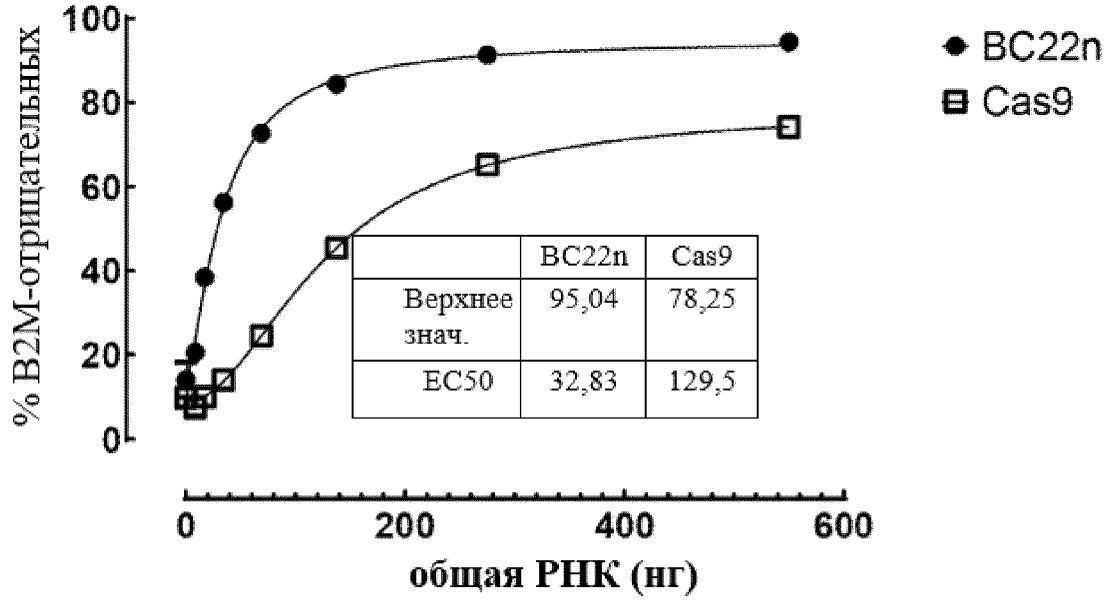
ФИГ. 4C


% общего числа считываний
100
80
60
40
20
0
Индел
C-в-A/G
C-в-T
0,0
8,6
17,2
34,4
68,8
137,5
275,0
550,0
BC22n
Cas9
общая РНК (нг)

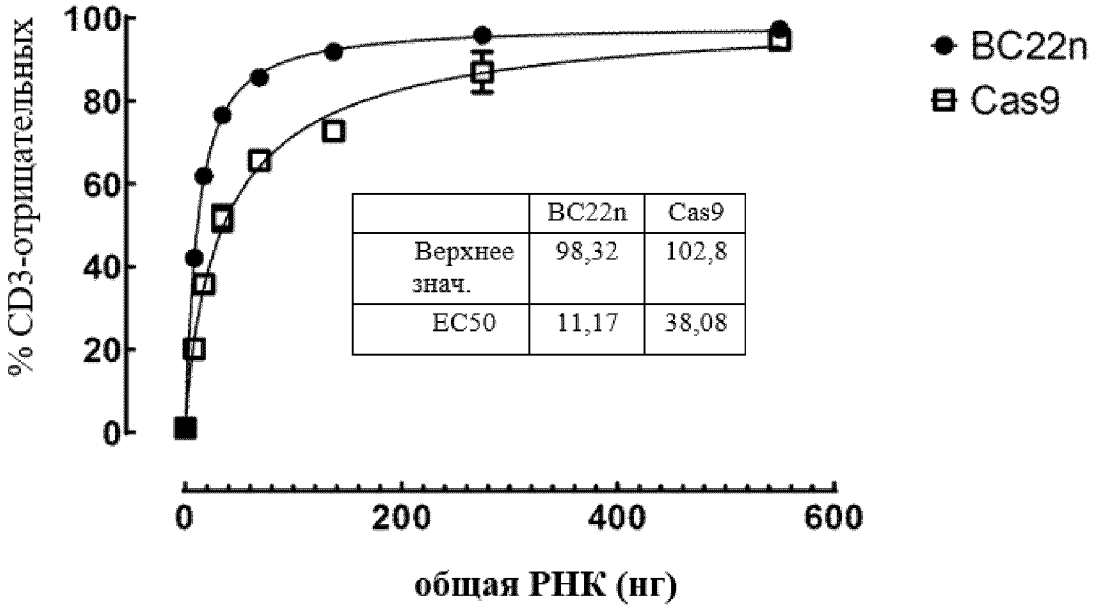
ФИГ. 4D


% B2M-отрицательных
100
80
60
40
20
0
0
200
400
600
общая РНК (нг)
BC22n
Cas9
BC22n
Cas9
Верхнее знач.
96,82
91,61
EC50
13,90
33,53

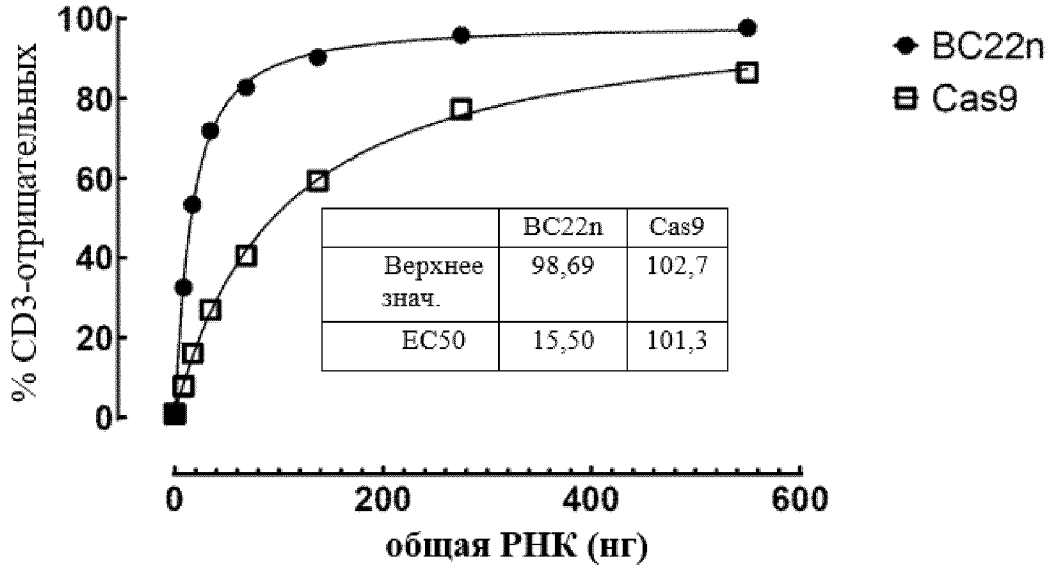
ФИГ.5А


% B2M-отрицательных
100
80
60
40
20
0
0
200
400
600
общая РНК (нг)
BC22n
Cas9
BC22n
Cas9
Верхнее знач.
95,04
78,25
EC50
32,83
129,5

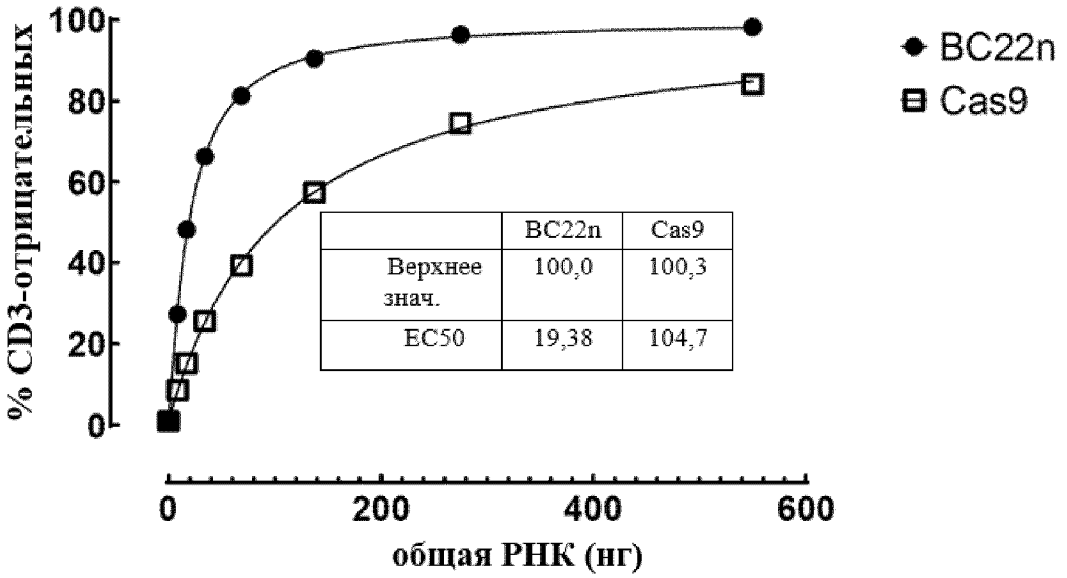
ФИГ. 5В


% CD3-отрицательных
100
80
60
40
20
0
0
200
400
600
общая РНК (нг)
BC22n
Cas9
BC22n Cas9
Верхнее знач. 98,32 102,8
EC50 11,17 38,08

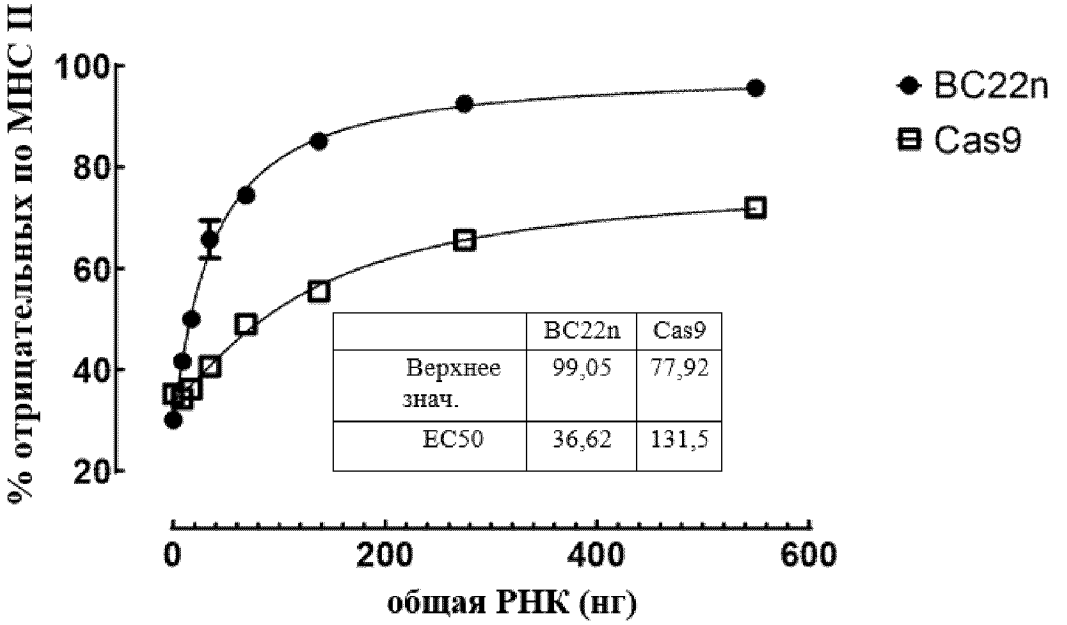
ФИГ. 5C


% CD3-отрицательных
100
80
60
40
20
0
0
200
400
600
общая РНК (нг)
BC22n
Cas9
BC22n Cas9
Верхнее знач. 98,69 102,7
EC50 15,50 101,3

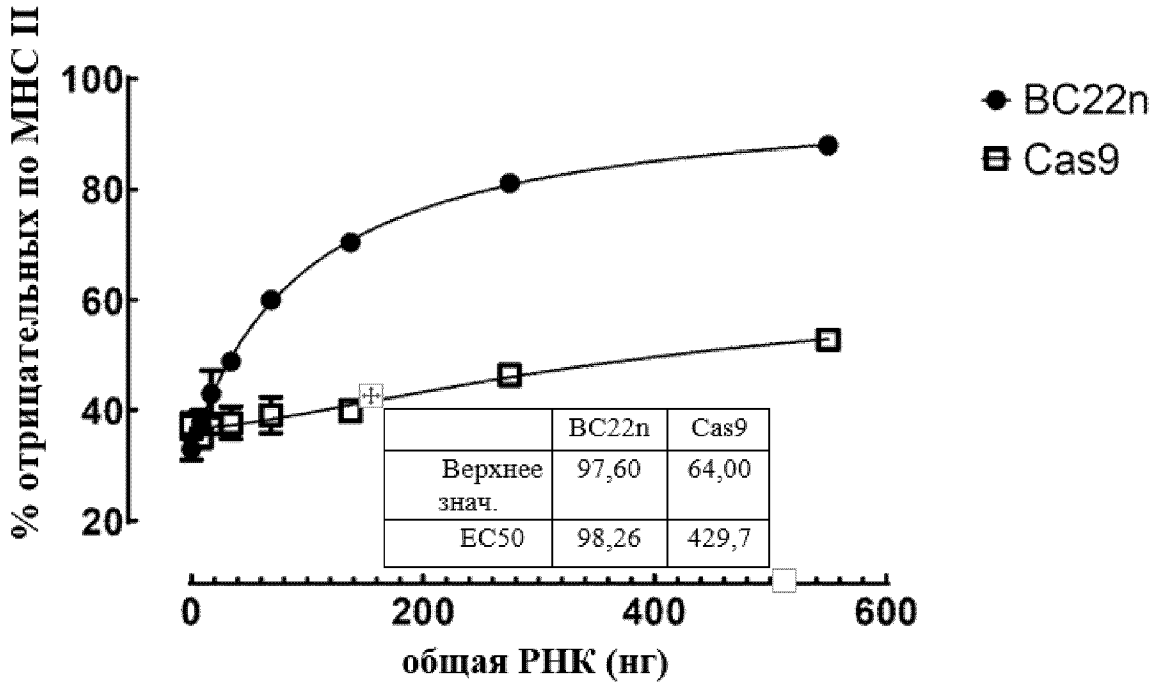
ФИГ.5D


% CD3-отрицательных
100
80
60
40
20
0
0
200
400
600
общая РНК (нг)
BC22n
Cas9
BC22n Cas9
Верхнее знач. 100,0 100,3
EC50 19,38 104,7

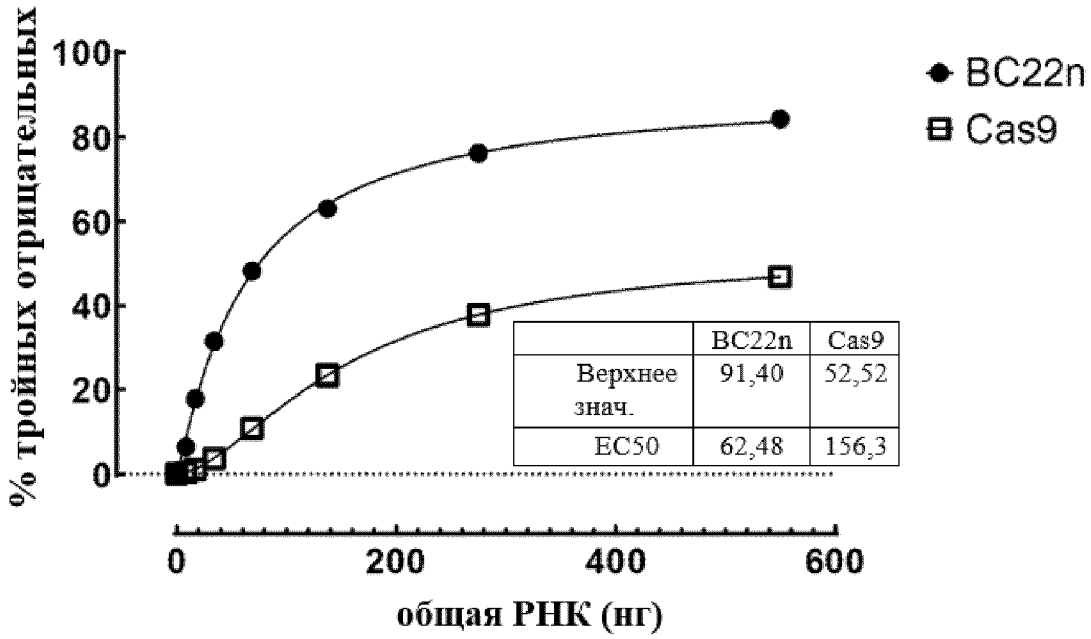
ФИГ. 5E


% отрицательных по МНС II
100
80
60
40
20
0
200
400
600
общая РНК (нг)
BC22n
Cas9
BC22n Cas9
Верхнее знач. 99,05 77,92
EC50 36,62 131,5

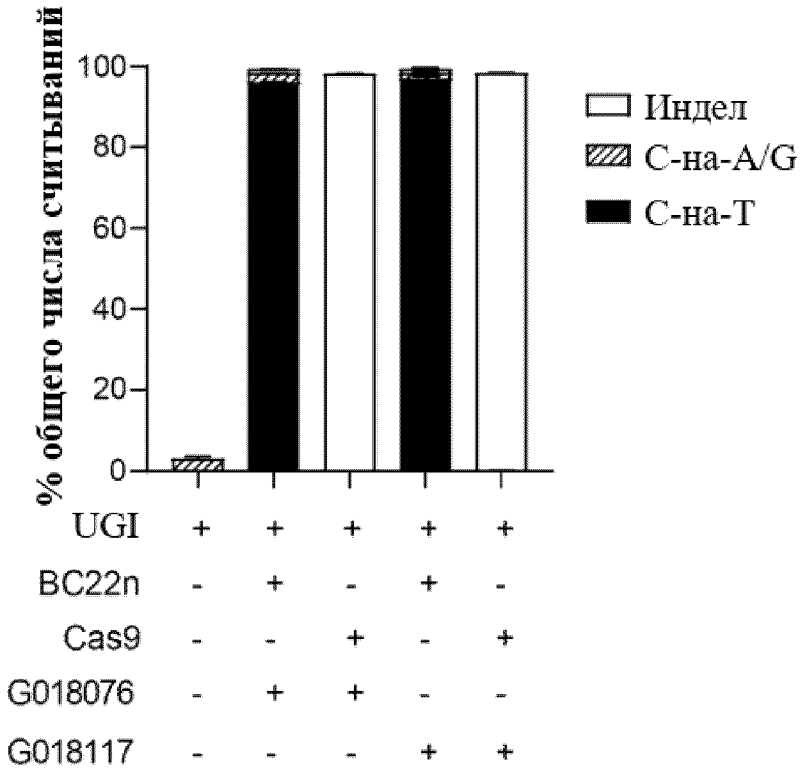
ФИГ. 5F


% отрицательных по MHC II
100
80
60
40
20
0
200
400
600
общая РНК (нг)
BC22n
Cas9
BC22n Cas9
Верхнее знач. 97,60 64,00
EC50 98,26 429,7

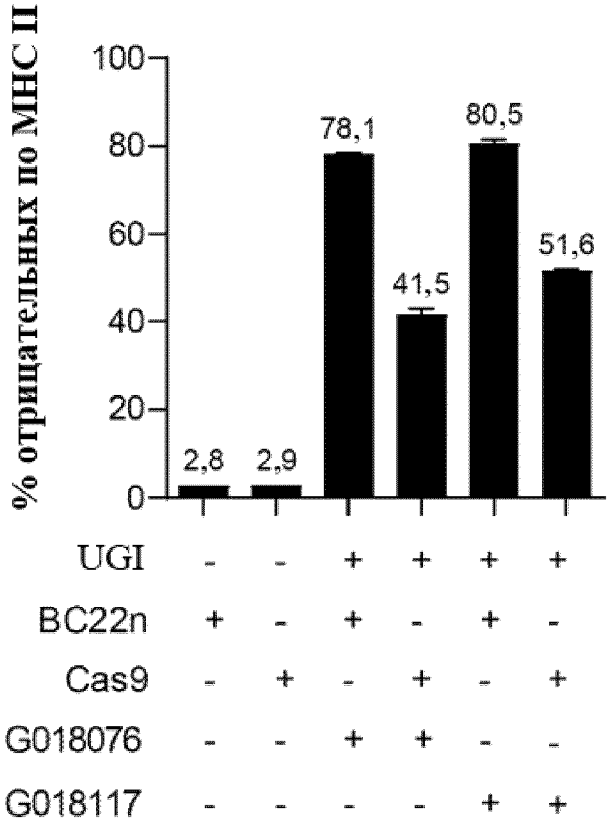
ФИГ. 5G


% тройных отрицательных
100
80
60
40
20
0
200
400
600
общая РНК (нг)
BC22n
Cas9
BC22n Cas9
Верхнее знач. 91,40 52,52
EC50 62,48 156,3

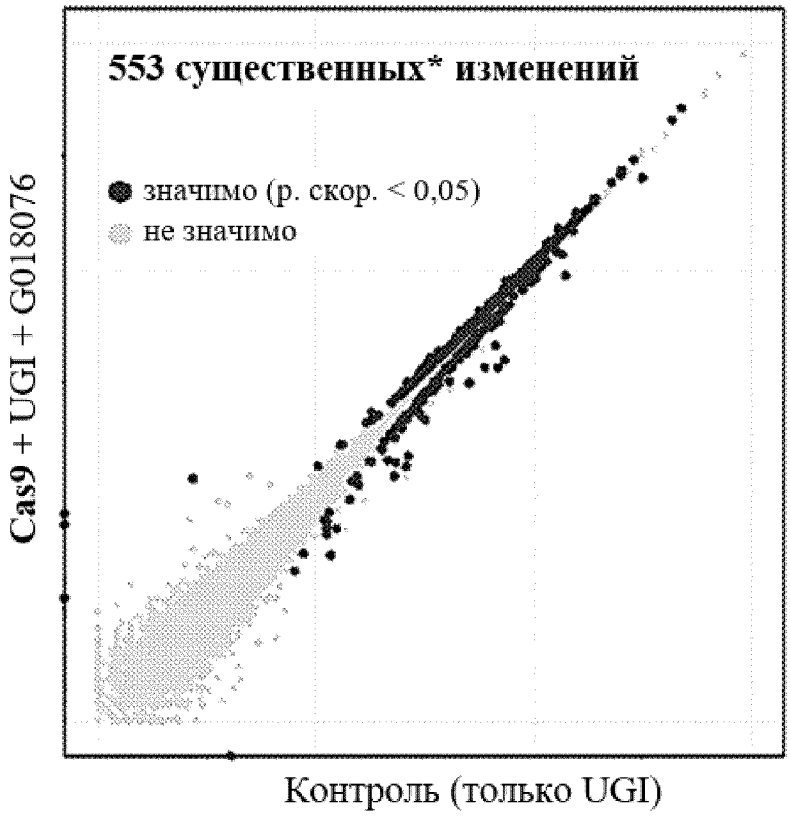
ФИГ. 5H


% общего числа считываний
100
80
60
40
20
0
Индел
С-на-A/G
С-на-T
UGI + + + + +
BC22n - + - + -
Cas9 - - + - +
G018076 - + + - -
G018117 - - - + +

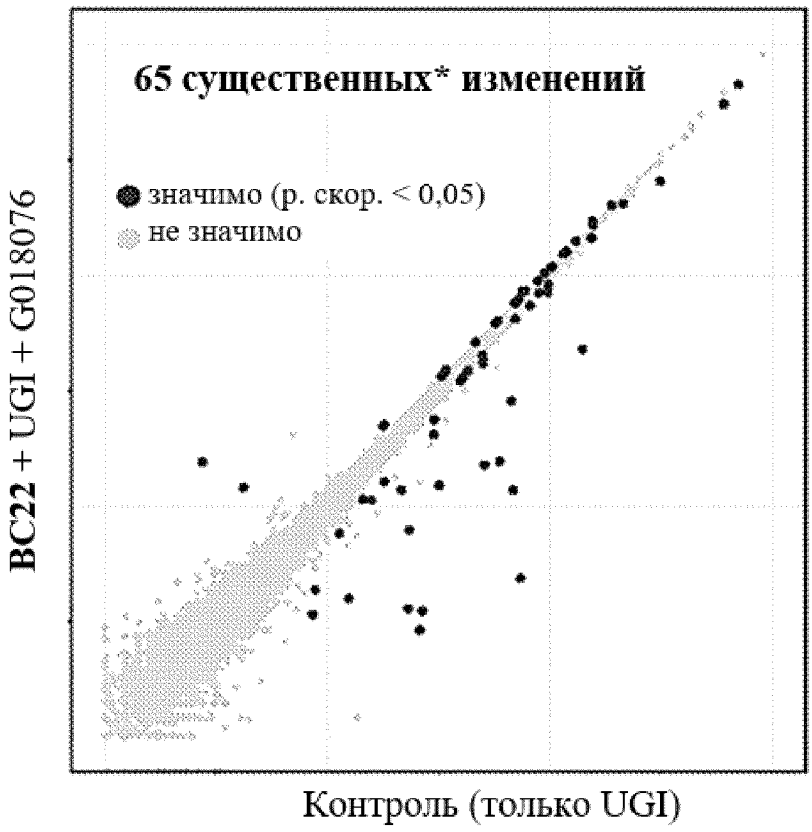
ФИГ. 6A


% отрицательных по MHC II
100
80
60
40
20
0
2,8
2,9
78,1
41,5
80,5
51,6
UGI - - + + + +
BC22n + - + - + -
Cas9 - + - + - +
G018076 - - + + - -
G018117 - - - - + +

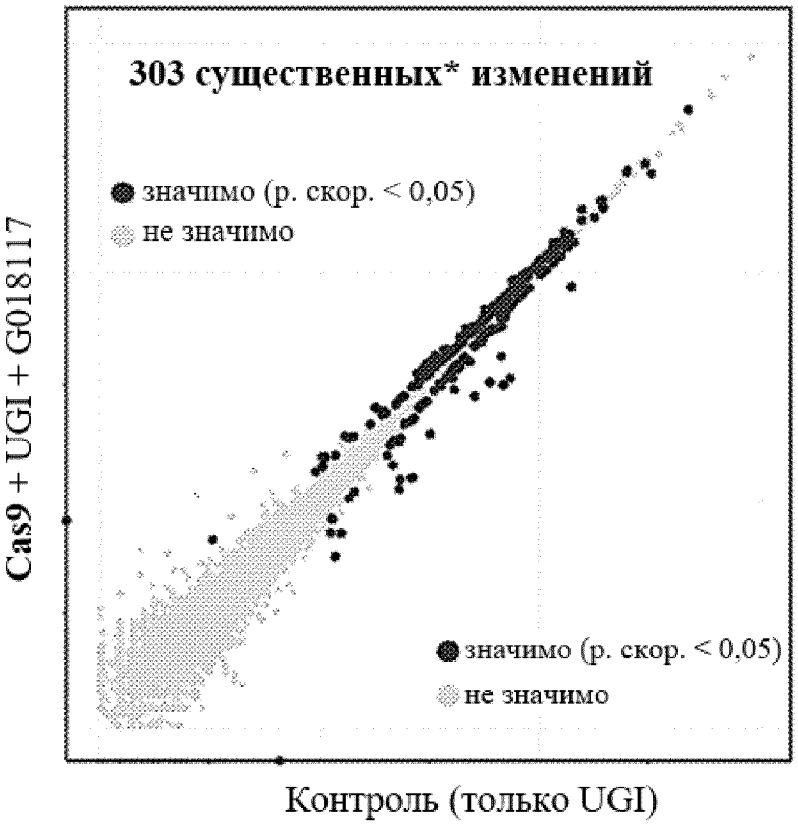
ФИГ. 6B


553 существенных* изменений
значимо (р. скор. < 0,05)
не значимо
Cas9 + UGI + G018076
Контроль (только UGI)

ФИГ. 7A


65 существенных* изменений
значимо (р. скор. < 0,05)
не значимо
BC22 + UGI + G018076
Контроль (только UGI)

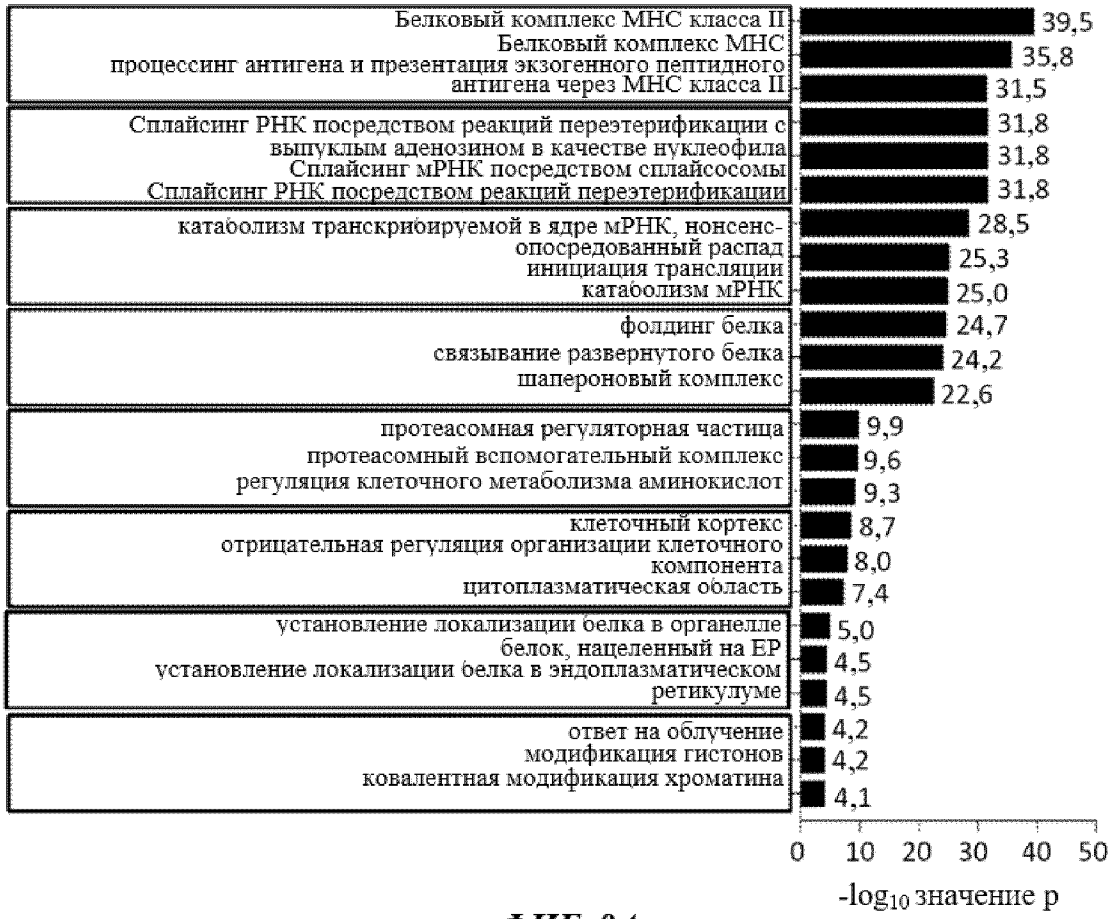
ФИГ. 7B


303 существенных* изменений
значимо (p. скор. < 0,05)
не значимо
значимо (p. скор. < 0,05)
не значимо
Cas9 + UGI + G018117
Контроль (только UGI)

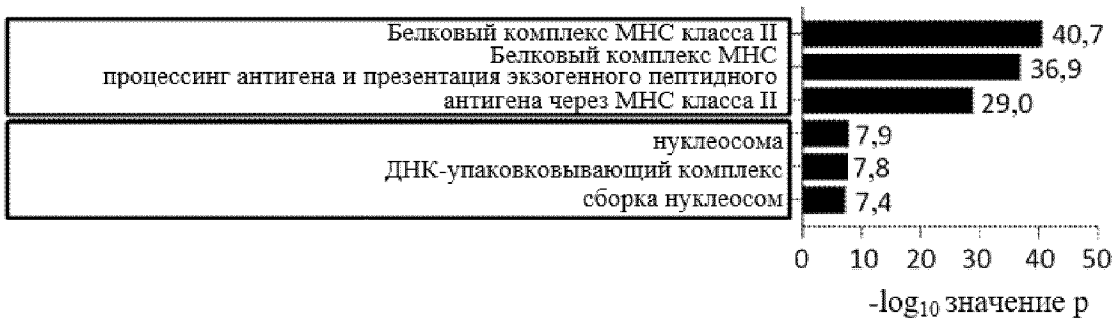
ФИГ. 7C


30 существенных* изменений
значимо (p. скор. < 0,05)
не значимо
BC22 + UGI + G018117
Контроль (только UGI)

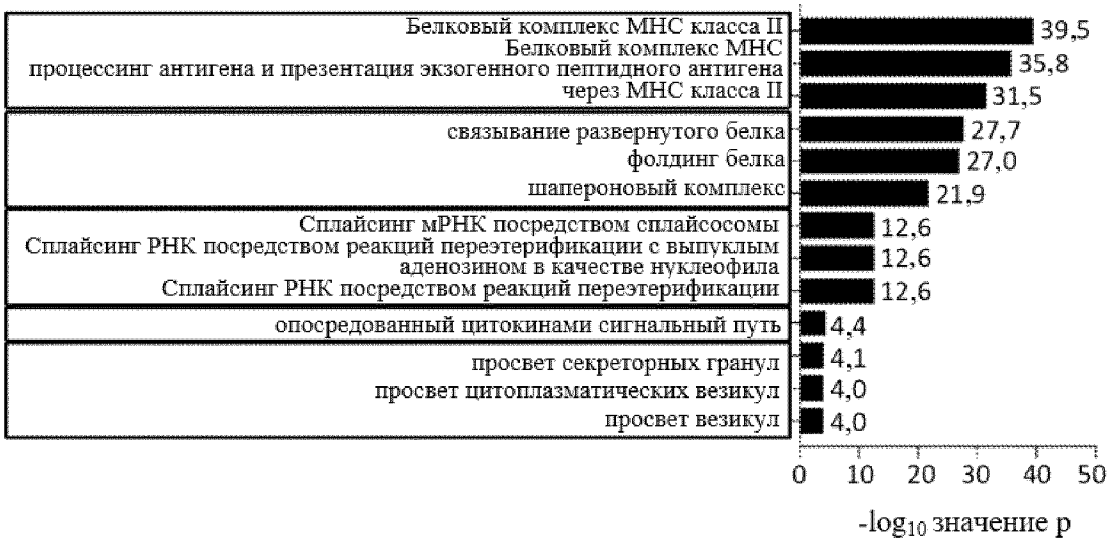
ФИГ. 7D


Белковый комплекс МНС класса II
Белковый комплекс МНС
процессинг антигена и презентация экзогенного пептидного
антигена через МНС класса II
Сплайсинг РНК посредством реакций переэтерификации с
выпуклым аденозином в качестве нуклеофила
Сплайсинг мРНК посредством сплайсосомы
Сплайсинг РНК посредством реакций переэтерификации
катаболизм транскрибируемой в ядре мРНК, нонсенс-
опосредованный распад
инициация трансляции
катаболизм мРНК
фолдинг белка
связывание развернутого белка
шапероновый комплекс
протеасомная регуляторная частица
протеасомный вспомогательный комплекс
регуляция клеточного метаболизма аминокислот
клеточный кортекс
отрицательная регуляция организации клеточного
компонента
цитоплазматическая область
установление локализации белка в органелле
белок, нацеленный на ЕР
установление локализации белка в эндоплазматическом
ретикулуме
ответ на облучение
модификация гистонов
ковалентная модификация хроматина
39,5
35,8
31,5
31,8
31,8
31,8
28,5
25,3
25,0
24,7
24,2
22,6
9,9
9,6
9,3
8,7
8,0
7,4
5,0
4,5
4,5
4,2
4,2
4,1
0
10
20
30
40
50
-log10 значение p

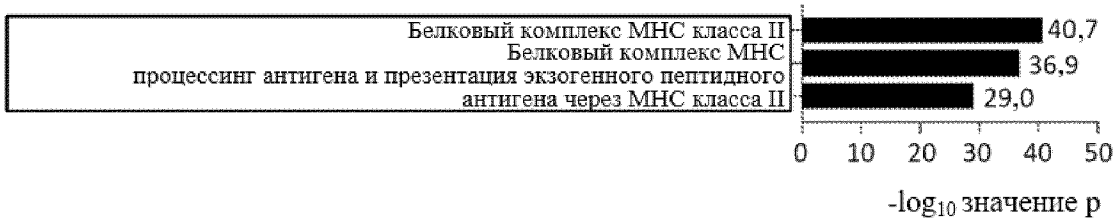
ФИГ. 8A


Белковый комплекс МНС класса II
Белковый комплекс МНС
процессинг антигена и презентация экзогенного пептидного
антигена через МНС класса II
нуклеосома
ДНК-упаковковывающий комплекс
сборка нуклеосом
40,7
36,9
29,0
7,9
7,8
7,4
0
10
20
30
40
50
-log10 значение p

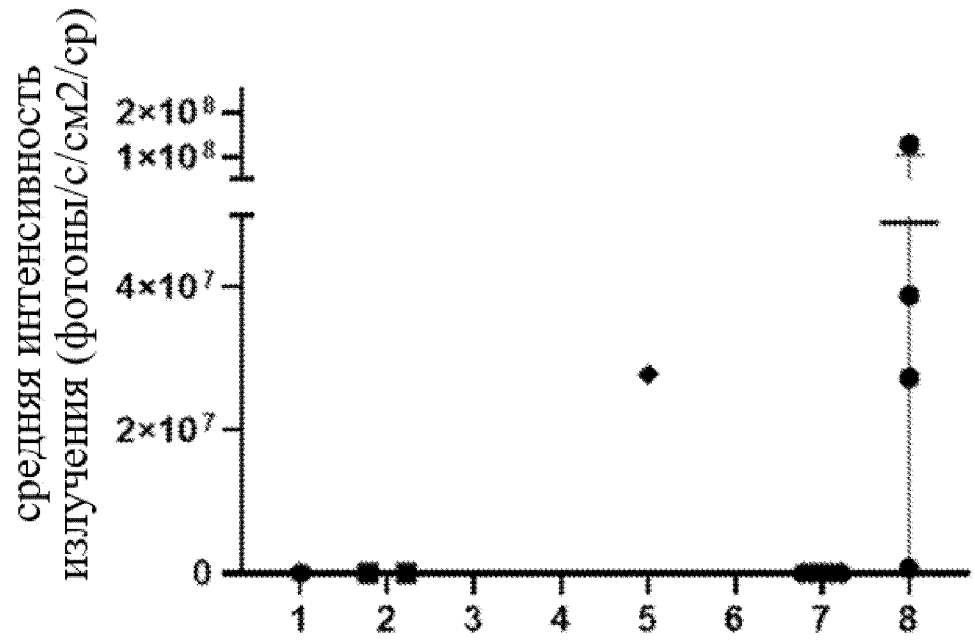
ФИГ. 8B


Белковый комплекс MHC класса II
Белковый комплекс MHC процессинг антигена и презентация экзогенного пептидного антигена через MHC класса II
связывание развернутого белка
фолдинг белка
шапероновый комплекс
Сплайсинг мРНК посредством сплайсосомы
Сплайсинг РНК посредством реакций переэтерификации с выпуклым аденозином в качестве нуклеофила
Сплайсинг РНК посредством реакций переэтерификации
опосредованный цитокинами сигнальный путь
просвет секреторных гранул
просвет цитоплазматических везикул
просвет везикул
39,5
35,8
31,5
27,7
27,0
21,9
12,6
12,6
12,6
4,4
4,1
4,0
4,0
0
10
20
30
40
50
-log10 значение p

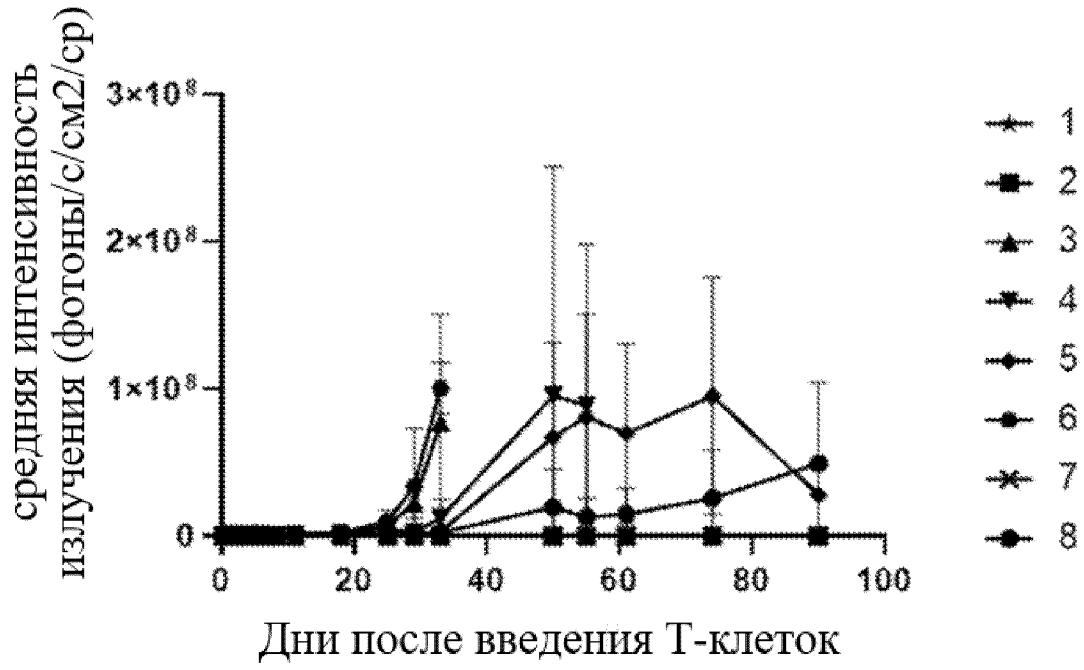
ФИГ.8C


Белковый комплекс MHC класса II
Белковый комплекс MHC процессинг антигена и презентация экзогенного пептидного антигена через MHC класса II
40,7
36,9
29,0
0
10
20
30
40
50
-log10 значение p

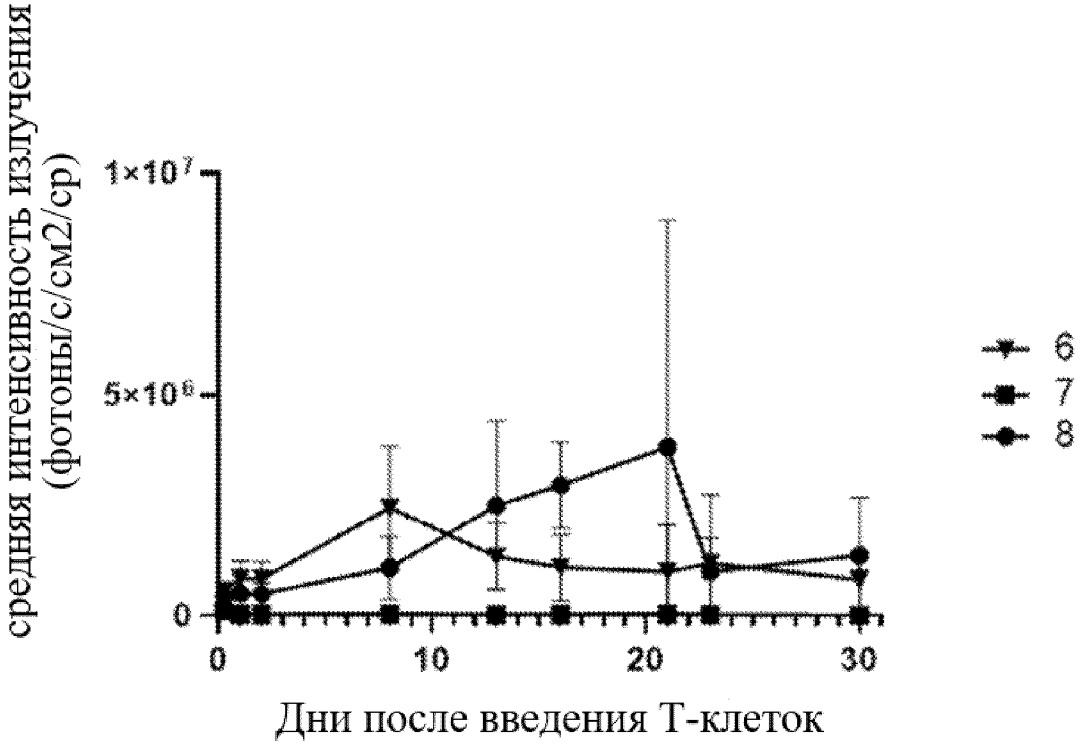
ФИГ. 8D


средняя интенсивность излучения (фотоны/с/см2/ср)
2×10^8
1×10^8
4×10^7
2×10^7
0
1
2
3
4
5
6
7
8

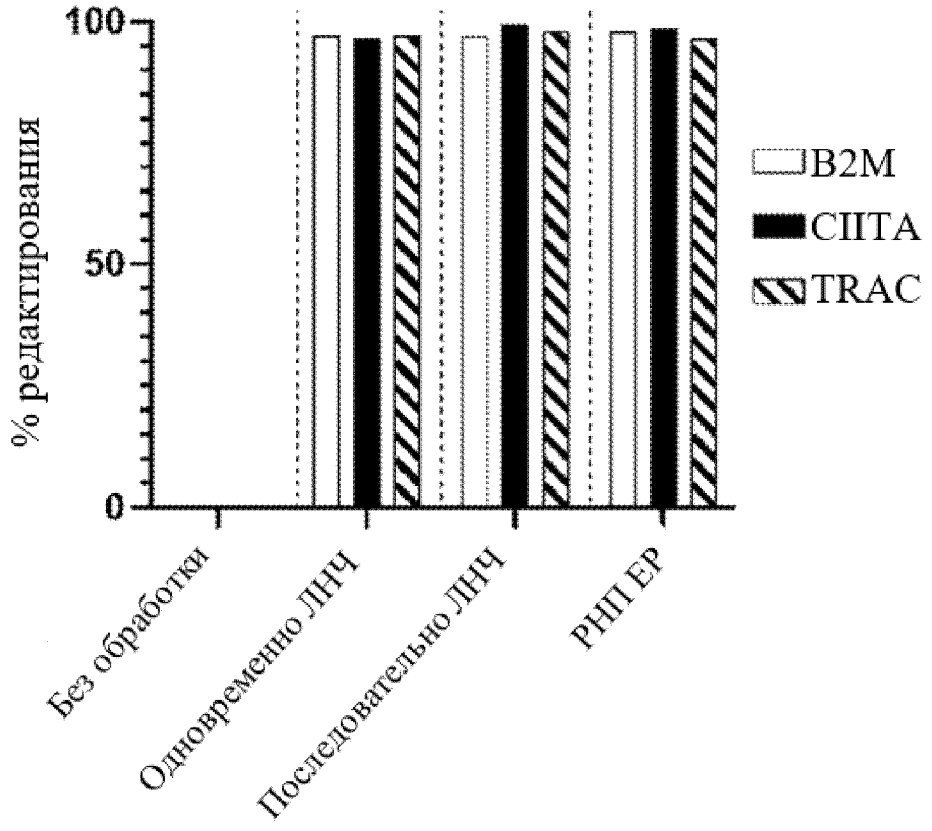
ФИГ. 9А


средняя интенсивность излучения (фотоны/с/см2/ср)
3×10^8
2×10^8
1×10^8
0
0
20
40
60
80
100
Дни после введения Т-клеток
1
2
3
4
5
6
7
8

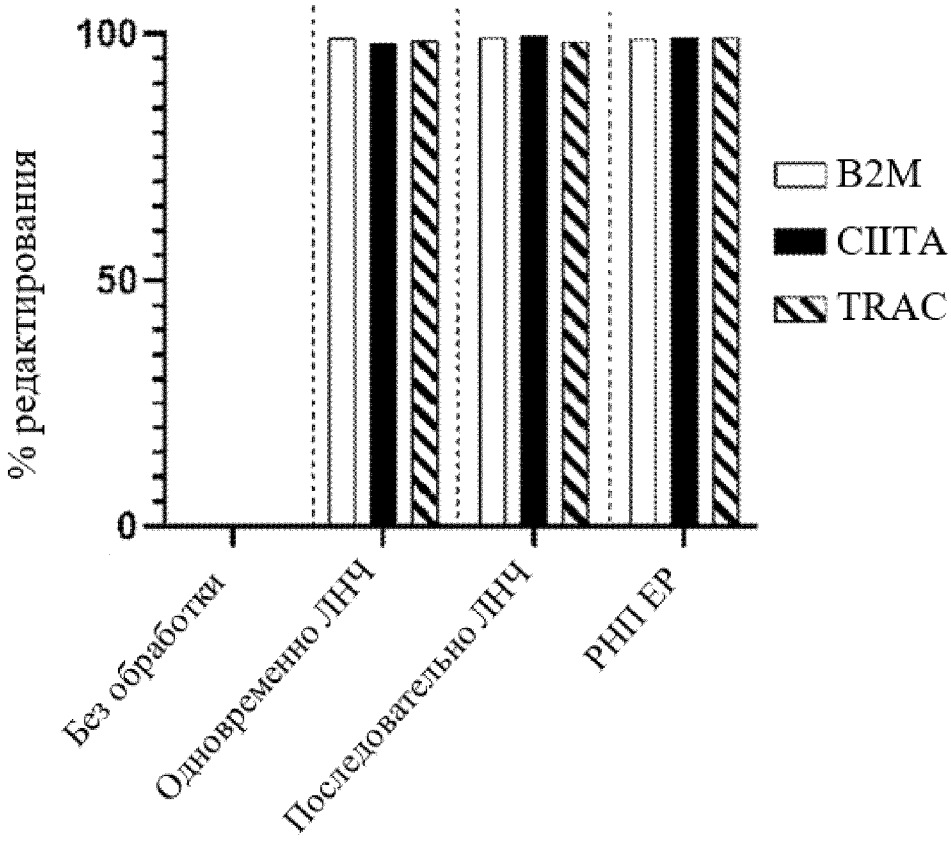
ФИГ. 9В


средняя интенсивность излучения
(фотоны/с/см2/ср)
1×10⁷
5×10⁶
0
0
10
20
30
Дни после введения Т-клеток
6
7
8

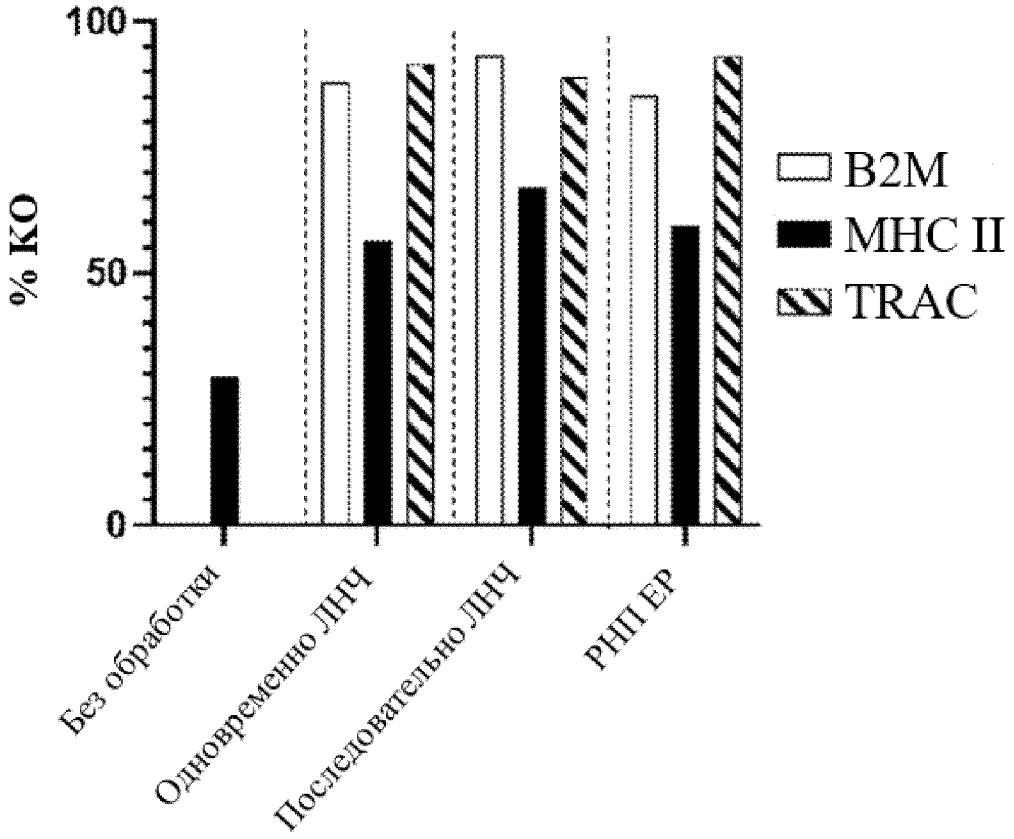
ФИГ. 9С



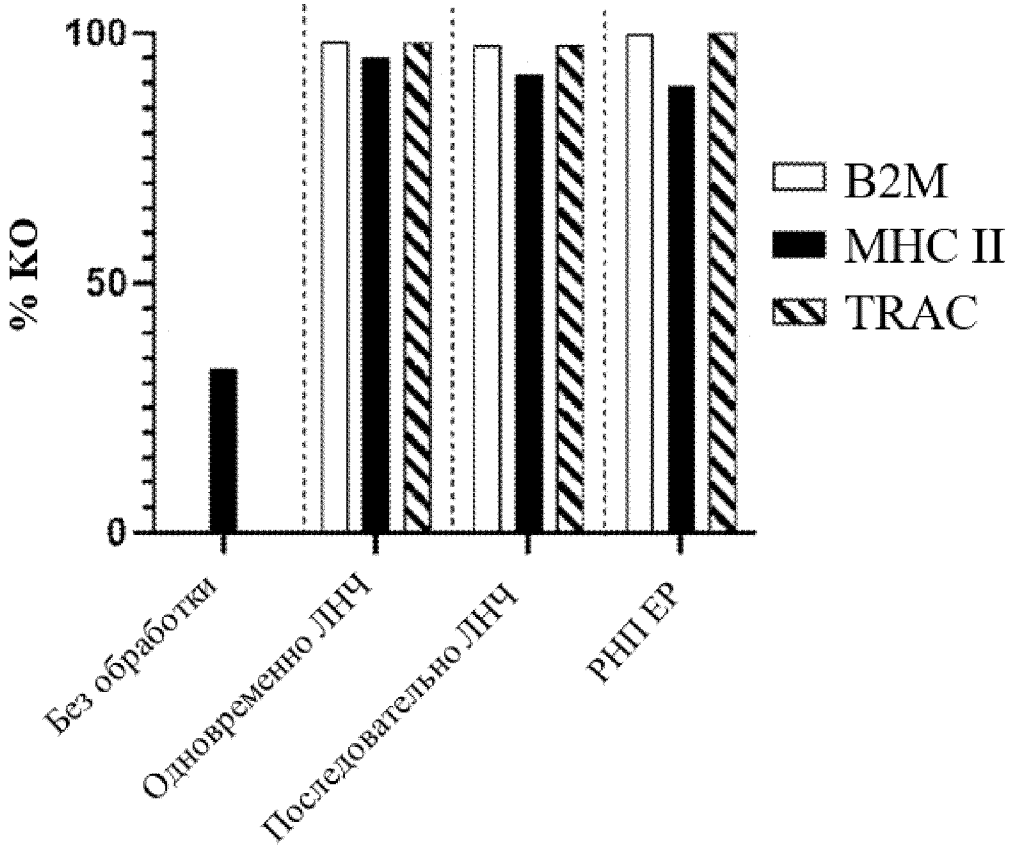
ФИГ. 10А



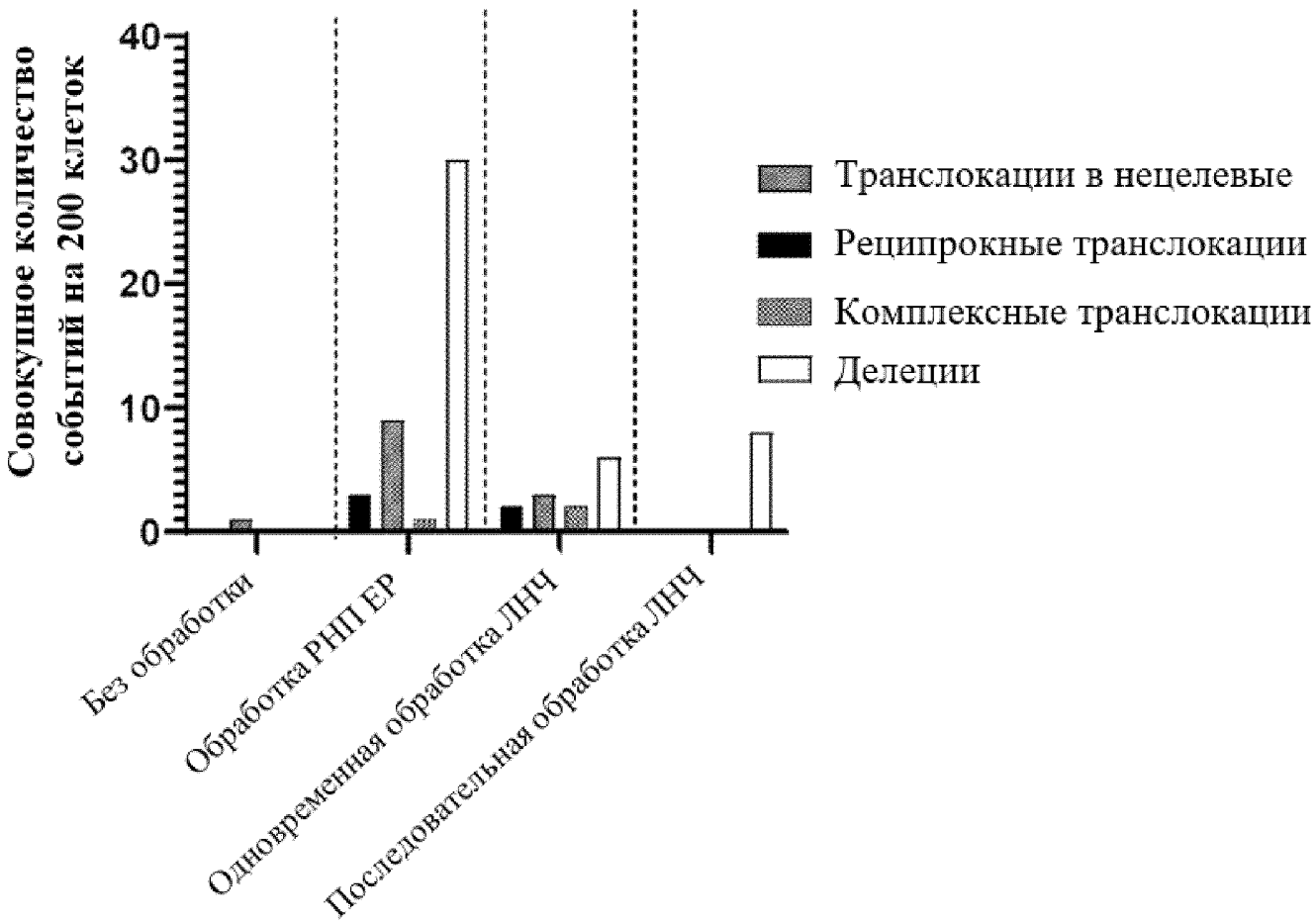
ФИГ. 10В



ФИГ. 11A



ФИГ. 11B


Совокупное количество событий на 200 клеток
40
30
20
10
0
Транслокации в нецелевые
Реципрокные транслокации
Комплексные транслокации
Делеции
Без обработки
Обработка РНП ЕР
Одновременная обработка ЛНЧ
Последовательная обработка ЛНЧ

ФИГ. 12