(19) Евразийское патентное ведомство

(21) 202391761 (13) A1

# (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
**2023.11.03**

(22) Дата подачи заявки
**2021.12.15**

(51) Int. Cl. ***A61K 38/45*** (2006.01)
***A61K 38/17*** (2006.01)
***C07K 14/46*** (2006.01)
***C12N 9/10*** (2006.01)

## (54) КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ МОДУЛИРОВАНИЯ УРОВНЯ ЭКСПРЕССИИ MYC

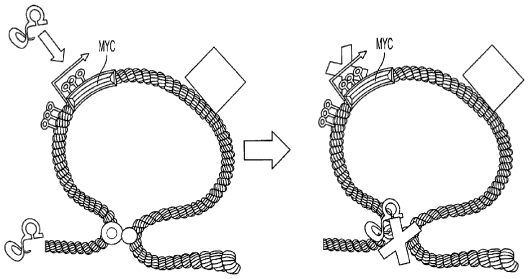
(31) **63/125,833; 63/137,097; 63/212,991; 63/281,022**
(32) **2020.12.15; 2021.01.13; 2021.06.21; 2021.11.18**
(33) **US**
(86) **PCT/US2021/010059**
(87) **WO 2022/132195 2022.06.23**
(88) **2022.07.28**

(71) Заявитель:
**ФЛЭГШИП ПАЙОНИРИНГ ИННОВЕЙШНЗ V, ИНК. (US)**

(72) Изобретатель:
**Витт Эбигэйл Элизабет, Фарелли Джеремайа Дейл, Шайдеггер Адам Вальтер, Сенапедис, мл., Уилльям Томас, Кеннеди Джоди Мишелль, Белагзал Худа, Ярар Дефне, Ли Юджин (US)**

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

(57) Настоящее изобретение относится к композициям и способам снижения уровня экспрессии гена MYC в клетке. В некоторых вариантах осуществления репрессор экспрессии содержит нацеливающуюся функциональную группу, которая связывает промотор MYC, якорную последовательность или суперэнхансер. В некоторых вариантах осуществления репрессор экспрессии содержит эффекторную функциональную группу, который репрессирует транскрипцию или метилирует ДНК. Также раскрыты системы, содержащие два репрессора экспрессии. Композиции можно применять, например, для лечения рака, такого как HCC или NSCLC.




202391761 A1

202391761 A1

# ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-578484EA/071

# КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ МОДУЛИРОВАНИЯ УРОВНЯ ЭКСПРЕССИИ MYC

## ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

Настоящая заявка испрашивает приоритет по предварительной заявке на патент США 63/125833, поданной 15 декабря 2020 года, предварительной заявке на патент США 63/137097, поданной 13 января 2021 года, предварительной заявке на патент США 63/212991, поданной 21 июня 2021 года, и предварительной заявке на патент США 63/281022, поданной 18 ноября 2021 года, полное содержание которых настоящим включено посредством ссылки.

## ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

Настоящая заявка содержит перечень последовательностей, который был подан в электронном виде в формате ASCII и включен в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. Указанная копия в формате ASCII, созданная 6 декабря 2021 года, называется O2057-7029WO_SL.txt и имеет размер 624274 байта.

## ПРЕДПОСЫЛКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Неправильная регуляция экспрессии генов является основной причиной многих заболеваний (например, у млекопитающих, например у людей), например неоплазии, неврологических нарушений, нарушений обмена веществ и ожирения. Неправильная регуляция фактора транскрипции MYC играет ключевую роль в развитии различных опухолей человека и хронических заболеваний печени. Белок MYC считается "не поддающимся лечению" по причине различных факторов, например, отсутствия определенного сайта связывания лиганда, физиологической функции, необходимой для поддержания нормальных тканей. Методики, направленные на модулирование экспрессии гена MYC, обеспечивают жизнеспособный альтернативный подход к лечению таких заболеваний. Существует потребность в новых инструментах, системах и способах для стабильного изменения, например снижения, уровня экспрессии генов, ассоциированных с заболеванием, таких как MYC.

## СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

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

В некоторых аспектах настоящее изобретение предусматривает репрессор экспрессии, содержащий нацеливающуюся функциональную группу, которая связывается с промотором гена-мишени, например промотором MYC, и необязательно эффекторную функциональную группу, где репрессор экспрессии способен снижать уровень экспрессии гена-мишени, например MYC.

В некоторых аспектах настоящее изобретение предусматривает репрессор экспрессии, содержащий нацеливающуюся функциональную группу, которая связывает локус гена-мишени, например MYC, и эффекторную функциональную группу,

содержащую MQ1 или ее фрагмент или вариант, где репрессор экспрессии способен снижать уровень экспрессии гена-мишени, например MYC.

В некоторых аспектах настоящее изобретение предусматривает репрессор экспрессии, содержащий нацеливающуюся функциональную группу, которая связывается с регуляторным элементом, расположенным в области суперэнхансера MYC, и необязательно эффекторную группу, где репрессор экспрессии способен снижать уровень экспрессии MYC.

В некоторых аспектах настоящее изобретение предусматривает репрессор экспрессии, содержащий нацеливающуюся функциональную группу, которая связывается с регуляторным элементом, расположенным в области суперэнхансера гена-мишени, например MYC, и эффекторную функциональную группу (например, KRAB или MQ1 или их фрагмент или вариант), где репрессор экспрессии способен снижать уровень экспрессии гена-мишени, например MYC.

В некоторых аспектах настоящее изобретение предусматривает репрессор экспрессии, содержащий нацеливающуюся функциональную группу, которая связывает регуляторный элемент, расположенный в области суперэнхансера гена-мишени, например MYC, где нацеливающаяся функциональная группа содержит домен по типу "цинкового пальца", где репрессор экспрессии способен снижать уровень экспрессии гена-мишени, например MYC.

В некоторых аспектах настоящее изобретение предусматривает репрессор экспрессии, содержащий нацеливающуюся функциональную группу, которая связывает регуляторный элемент, расположенный в области суперэнхансера MYC, где нацеливающаяся функциональная группа содержит домен по типу "цинкового пальца" или эффекторный домен TAL, и эффекторную функциональную группу, где эффекторная функциональная группа содержит репрессор транскрипции (например, KRAB или его фрагмент или вариант) или ДНК-метилтрансферазу (например, MQ1 или ее функциональную группу или вариант); где репрессор экспрессии способен снижать уровень экспрессии MYC.

В некоторых аспектах настоящее изобретение предусматривает репрессор экспрессии, содержащий нацеливающуюся функциональную группу, которая связывает локус гена-мишени, например MYC, где нацеливающаяся функциональная группа содержит домен по типу "цинкового пальца", где репрессор экспрессии способен снижать уровень экспрессии гена-мишени, например MYC.

В некоторых аспектах настоящее изобретение предусматривает репрессор экспрессии, содержащий нацеливающуюся функциональную группу, которая связывает геномный локус, содержащий по меньшей мере 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 нуклеотидов из последовательности под SEQ ID NO: 1, 3, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 109, 110 или 75, 76, 78, 79, 80, 81, 84, 85, 86, где репрессор экспрессии способен снижать уровень экспрессии MYC.

В некоторых аспектах настоящее изобретение предусматривает репрессор

экспрессии, содержащий нацеливающуюся функциональную группу, которая связывает геномный локус, содержащий по меньшей мере 16, 17, 18, 19 или 20 нуклеотидов из последовательности под SEQ ID NO: 2 или 77, 82, 83, и где репрессор экспрессии способен снижать уровень экспрессии гена-мишени, например MYC. В некоторых вариантах осуществления репрессор экспрессии содержит эффекторную функциональную группу.

В некоторых аспектах настоящее изобретение предусматривает репрессор экспрессии, содержащий нацеливающуюся функциональную группу, где нацеливающаяся функциональная группа связывает геномный локус, который находится в пределах 1400 нт выше или ниже SEQ ID NO: 4.

В некоторых аспектах настоящее изобретение предусматривает репрессор экспрессии, содержащий нацеливающуюся функциональную группу, где нацеливающаяся функциональная группа связывает геномный локус, содержащий по меньшей мере 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 нуклеотидов из последовательности под SEQ ID NO: 4, 77, 82 или 83.

В некоторых аспектах настоящее изобретение предусматривает репрессор экспрессии, содержащий нацеливающуюся функциональную группу, где нацеливающаяся функциональная группа связывает геномный локус, содержащий по меньшей мере 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 нуклеотидов из последовательности под SEQ ID NO: 83, 96 или 108.

В некоторых аспектах настоящее изобретение предусматривает систему, содержащую первый репрессор экспрессии, содержащий первую нацеливающуюся функциональную группу и необязательно первую эффекторную функциональную группу, где первый репрессор экспрессии связывается с регуляторным элементом транскрипции (например, промотором или сайтом начала транскрипции (TSS)), функционально связанным с геном-мишенью, например MYC, или с последовательностью, проксимальной по отношению к регуляторному элементу транскрипции, и второй репрессор экспрессии, содержащий вторую нацеливающуюся функциональную группу и необязательно вторую эффекторную функциональную группу, где второй репрессор экспрессии связывается с якорной последовательностью из объединения, опосредованного якорной последовательностью (ASMC), содержащего ген-мишень, например MYC, или последовательностью, проксимальной по отношению к якорной последовательности.

В некоторых аспектах настоящее изобретение предусматривает систему, содержащую первый репрессор экспрессии, содержащий первую нацеливающуюся функциональную группу и необязательно первую эффекторную функциональную группу, где первый репрессор экспрессии связывается с регуляторным элементом транскрипции (например, промотором или сайтом начала транскрипции (TSS)), функционально связанным с геном-мишенью, например MYC, или с последовательностью, проксимальной по отношению к регуляторному элементу транскрипции, и второй репрессор экспрессии, содержащий вторую нацеливающуюся функциональную группу и необязательно вторую эффекторную функциональную группу, где второй репрессор

экспрессии связывается с геномным локусом, расположенным в области суперэнхансера гена-мишени, например MYC.

В некоторых вариантах осуществления первая нацеливающаяся функциональная группа, специфически связывает первую последовательность ДНК, и вторая нацеливающаяся функциональная группа специфически связывает вторую последовательность ДНК, отличающуюся от первой последовательности ДНК. В некоторых вариантах осуществления первая эффекторная функциональная группа отличается от второй эффекторной функциональной группы.

В некоторых аспектах настоящее изобретение предусматривает репрессор экспрессии, содержащий нацеливающуюся функциональную группу, предусматривающую молекулу CRISPR/Cas, например предусматривающую каталитически неактивный белок CRISPR/Cas, который связывается с регуляторным элементом транскрипции (например, промотором или сайтом начала транскрипции (TSS)), функционально связанным с геном-мишенью, например MYC, или последовательностью, проксимальной по отношению к указанному регуляторному элементу транскрипции; и эффекторную функциональную группу, содержащую MQ1 или ее функциональный вариант или фрагмент.

В некоторых аспектах настоящее изобретение предусматривает репрессор экспрессии, содержащий нацеливающуюся функциональную группу, предусматривающую молекулу CRISPR/Cas, например предусматривающую каталитически неактивный белок CRISPR/Cas, который связывается с геномным локусом, расположенным в области суперэнхансера гена-мишени, например MYC, и эффекторную функциональную группу, содержащую KRAB, MQ1 или их функциональный вариант или фрагмент, где репрессор экспрессии способен снижать уровень экспрессии гена-мишени, например MYC.

В некоторых аспектах настоящее изобретение предусматривает репрессор экспрессии, содержащий нацеливающуюся функциональную группу, предусматривающую молекулу CRISPR/Cas, например предусматривающую каталитически неактивный белок CRISPR/Cas, который связывается с якорной последовательностью из объединения, опосредованного якорной последовательностью (ASMC), содержащего ген-мишень, например MYC, или с последовательностью, расположенной проксимально по отношению к якорной последовательности; и эффекторную функциональную группу, содержащую KRAB или его функциональный вариант или фрагмент.

В некоторых аспектах настоящее изобретение предусматривает репрессор экспрессии, содержащий нацеливающуюся функциональную группу, предусматривающую молекулу с "цинковыми пальцами", которая связывается с регуляторным элементом транскрипции (например, промотором или сайтом начала транскрипции (TSS)), функционально связанным с геном-мишенью, например MYC; или последовательностью, проксимальной по отношению к указанному регуляторному

элементу транскрипции; и эффекторную функциональную группу, содержащую MQ1 или ее функциональный вариант или фрагмент.

В некоторых аспектах настоящее изобретение предусматривает репрессор экспрессии, содержащий нацеливающуюся функциональную группу, предусматривающую молекулу с "цинковыми пальцами", которая связывается с якорной последовательностью из объединения, опосредованного якорной последовательностью (ASMC), содержащего ген-мишень, например MYC, или последовательностью, проксимальной по отношению к указанному регуляторному элементу транскрипции; и эффекторную функциональную группу, содержащую KRAB или его функциональный вариант или фрагмент.

В некоторых аспектах настоящее изобретение предусматривает репрессор экспрессии, содержащий нацеливающуюся функциональную группу, предусматривающую молекулу с "цинковыми пальцами", которая связывается с геномным локусом, расположенным в области суперэнхансера гена-мишени, например MYC, и эффекторную функциональную группу, содержащую KRAB или его функциональный вариант или фрагмент.

В некоторых аспектах настоящее изобретение направлено на нуклеиновую кислоту, кодирующую первый репрессор экспрессии, второй репрессор экспрессии, их оба или их компонент (например, gRNA, mRNA). В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота, кодирующая систему репрессора экспрессии, представляет собой мультицистронную последовательность. В некоторых вариантах осуществления мультицистронная последовательность представляет собой бицистронную последовательность.

В некоторых аспектах настоящее изобретение направлено на вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, систему или репрессор экспрессии, описанные в данном документе. В другом аспекте настоящее изобретение направлено на липидную наночастицу, содержащую вектор, нуклеиновую кислоту, систему или репрессор экспрессии, описанные в данном документе. В другом аспекте настоящее изобретение направлено на реакционную смесь, содержащую репрессор экспрессии, систему, нуклеиновую кислоту, вектор или липидную наночастицу, описанные в данном документе. В другом аспекте настоящее изобретение направлено на фармацевтическую композицию, содержащую репрессор экспрессии, систему, нуклеиновую кислоту, вектор, липидную наночастицу или реакционную смесь, описанные в данном документе.

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

В некоторых аспектах настоящее изобретение направлено на способ лечения

состояния, ассоциированного с чрезмерной экспрессией гена-мишени, например MYC, у субъекта, включающий введение субъекту репрессора экспрессии или системы, нуклеиновой кислоты или вектора, описанных в данном документе, с обеспечением таким образом лечения состояния.

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

В некоторых аспектах настоящее изобретение предусматривает способ снижения уровня экспрессии гена-мишени, например MYC, в клетке, при этом способ включает приведение клетки в контакт с системой, содержащей первый репрессор экспрессии, содержащий первую нацеливающуюся функциональную группу и необязательно первую эффекторную функциональную группу, где первый репрессор экспрессии связывается с регуляторным элементом транскрипции (например, промотором или сайтом начала транскрипции (TSS)), функционально связанным с геном-мишенью, например MYC, и второй репрессор экспрессии, содержащий вторую нацеливающую функциональную группу и необязательно вторую эффекторную функциональную группу, где второй репрессор экспрессии связывается с якорной последовательностью из объединения, опосредованного якорной последовательностью (ASMC), содержащего ген-мишень, например MYC, или с последовательностью, проксимальной по отношению к якорной последовательности, тем самым снижая уровень экспрессии гена-мишени, например MYC, в клетке.

В некоторых аспектах настоящее изобретение предусматривает способ снижения уровня экспрессии гена-мишени, например MYC, в клетке, где способ включает приведение клетки в контакт с системой, содержащей первый репрессор экспрессии, содержащий первую нацеливающуюся функциональную группу и необязательно первую эффекторную функциональную группу, где первый репрессор экспрессии связывается с регуляторным элементом транскрипции (например, промотором или сайтом начала транскрипции (TSS)), функционально связанным с геном-мишенью, например MYC, и второй репрессор экспрессии, содержащий вторую нацеливающую функциональную группу и необязательно вторую эффекторную функциональную группу, где второй репрессор экспрессии связывается с геномным локусом, расположенным в области суперэнхансера гена-мишени, например MYC, тем самым снижая уровень экспрессии гена-мишени, например MYC, в клетке.

Настоящее изобретение дополнительно предусматривает, к тому же, набор, содержащий а) контейнер, содержащий композицию, содержащую репрессор экспрессии, содержащий нацеливающуюся функциональную группу, которая связывается с геном-мишенью, промотор, например MYC, и эффекторную функциональную группу, способную модулировать, например снижать, уровень экспрессии гена-мишени, например

MYC, и b) набор инструкций, предусматривающий по меньшей мере один способ модулирования уровня экспрессии гена-мишени, например MYC, в клетке с помощью указанной композиции.

Настоящее изобретение дополнительно предусматривает, к тому же, набор, содержащий a) контейнер, содержащий композицию, содержащую репрессор экспрессии, содержащий нацеливающуюся функциональную группу, которая связывается с локусом, расположенным в области суперэнхансера гена-мишени, например MYC, и эффекторную функциональную группу, способную модулировать, например снижать, уровень экспрессии гена-мишени, например MYC, и b) набор инструкций, предусматривающий по меньшей мере один способ модулирования уровня экспрессии гена-мишени, например MYC, в клетке с помощью указанной композиции.

В некоторых аспектах набор содержит a) контейнер, содержащий композицию, содержащую систему, содержащую два репрессора экспрессии, предусматривающие первый репрессор экспрессии, содержащий первую нацеливающуюся функциональную группу и необязательно первую эффекторную функциональную группу, где первый репрессор экспрессии связывается с регуляторным элементом транскрипции (например, промотором или сайтом начала транскрипции (TSS)), функционально связанным с геном-мишенью, например MYC, или с последовательностью, проксимальной по отношению к регуляторному элементу транскрипции, и второй репрессор экспрессии, содержащий вторую нацеливающуюся функциональную группу и необязательно эффекторную функциональную группу, где второй репрессор экспрессии связывается с якорной последовательностью из объединения, опосредованного якорной последовательностью (ASMC), содержащего ген-мишень, например MYC, или последовательностью, проксимальной по отношению к якорной последовательности.

В некоторых аспектах набор содержит a) контейнер, содержащий композицию, содержащую систему, содержащую два репрессора экспрессии, предусматривающие первый репрессор экспрессии, содержащий первую нацеливающуюся функциональную группу и необязательно первую эффекторную функциональную группу, где первый репрессор экспрессии связывается с регуляторным элементом транскрипции (например, промотором или сайтом начала транскрипции (TSS)), функционально связанным с геном-мишенью, например MYC, или с последовательностью, проксимальной по отношению к регуляторному элементу транскрипции, и второй репрессор экспрессии, содержащий вторую нацеливающуюся функциональную группу и необязательно эффекторную функциональную группу, где второй репрессор экспрессии связывается с геномным локусом, расположенным в области суперэнхансера гена-мишени, например MYC.

В некоторых вариантах осуществления набор дополнительно содержит b) набор инструкций, предусматривающий по меньшей мере один способ лечения заболевания или модулирования, например снижения, уровня экспрессии гена-мишени, например MYC, в клетке с помощью указанной композиции. В некоторых вариантах осуществления наборы могут необязательно включать средство доставки для указанной композиции (например,

липидную наночастицу). Реагенты могут быть предоставлены во взвешенном состоянии во вспомогательном веществе и/или в средстве доставки или могут быть предоставлены в виде отдельного компонента, который впоследствии может быть объединен со вспомогательным веществом и/или средством доставки. В некоторых вариантах осуществления наборы могут необязательно содержать дополнительные терапевтические средства для совместного введения с композициями для воздействия на уровень экспрессии требуемого гена-мишени, например модулирования уровня экспрессии гена MYC. Хотя инструкционные материалы обычно содержат письменные или печатные материалы, они не ограничиваются таковыми. Предполагается любой носитель, способный хранить такие инструкции и передавать их конечному пользователю, по настоящему изобретению. Такие носители включают без ограничения электронные носители данных (например, магнитные диски, кассеты, картриджи, чипы), оптические носители (например, CD-ROM) и т. п. Такие средства массовой информации могут включать адреса интернет-сайтов, которые предоставляют такие инструкционные материалы.

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

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

Все публикации, заявки на патенты, патенты и другие литературные источники (например, регистрационные номера в базах данных последовательностей), упомянутые в данном документе, включены в данный документ посредством ссылки в их полном объеме. Например, все последовательности из GenBank, UniGene и Entrez, упомянутые в данном документе, например в любой таблице данного документа, включены посредством ссылки. Если не указано иное, то номера доступа последовательностей, указанные в данном документе, в том числе в любой таблице данного документа, относятся к записям в базах данных по состоянию на 15 декабря 2020 года. Если один ген или белок относится к множеству номеров доступа последовательности, то охвачены все варианты последовательности.

ПРОНУМЕРОВАННЫЕ ВАРИАНТЫ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ

1. Репрессор экспрессии, содержащий

нацеливающуюся функциональную группу, которая связывается с промотором MYC, и

необязательно эффекторную функциональную группу,

где репрессор экспрессии способен снижать уровень экспрессии MYC.

2. Репрессор экспрессии согласно варианту осуществления 1, где нацеливающаяся

функциональная группа связывает геномный локус, который находится в пределах 1400, 1200, 1000, 800, 600, 400 или 200 нт выше или ниже SEQ ID NO: 4, 199 или 201.

3. Репрессор экспрессии согласно варианту осуществления 1, где нацеливающаяся функциональная группа связывает геномный локус, содержащий по меньшей мере 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 нуклеотидов из последовательности под SEQ ID NO: 4, 77, 82, 83, 85, 199 или 201.

4. Репрессор экспрессии, содержащий

нацеливающуюся функциональную группу, которая связывает геномный локус, содержащий по меньшей мере 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 нуклеотидов из последовательности под SEQ ID NO: 3, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 109, 110, 75, 76, 78, 79, 80, 81, 84, 85, 86, 190, 191 , 192, 200, или 202, и

необязательно эффекторную функциональную группу,

где репрессор экспрессии способен снижать уровень экспрессии MYC.

5. Репрессор экспрессии, содержащий

нацеливающуюся функциональную группу, которая связывает геномный локус, содержащий по меньшей мере 16, 17, 18, 19 или 20 нуклеотидов из последовательности под SEQ ID NO: 2, 77, 82, 83, 199 или 201, и

необязательно эффекторную функциональную группу,

где репрессор экспрессии способен снижать уровень экспрессии MYC.

6. Репрессор экспрессии, содержащий

нацеливающуюся функциональную группу, которая связывает локус MYC, и

эффекторную функциональную группу, содержащую MQ1 или ее фрагмент или вариант,

где репрессор экспрессии способен снижать уровень экспрессии MYC.

7. Репрессор экспрессии, содержащий

нацеливающуюся функциональную группу, которая связывает локус в области суперэнхансера MYC,

необязательно эффекторную функциональную группу, например эффекторную функциональную группу, содержащую ДНК-метилтрансферазу, где необязательно эффекторная функциональная группа содержит MQ1 или ее фрагмент или вариант,

где репрессор экспрессии способен снижать уровень экспрессии MYC.

8. Репрессор экспрессии, содержащий

нацеливающуюся функциональную группу, которая связывает локус в области суперэнхансера MYC,

эффекторную функциональную группу, содержащую репрессор транскрипции, где необязательно эффекторная функциональная группа содержит KRAB или его фрагмент или вариант,

где репрессор экспрессии способен снижать уровень экспрессии MYC.

9. Репрессор экспрессии согласно варианту осуществления 7 или 8, где нацеливающаяся функциональная группа связывает геномный локус, содержащий по

меньшей мере 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 нуклеотидов из последовательности под любым из SEQ ID NO: 96-110, 83, 199, 201.

10. Репрессор экспрессии согласно любому из вариантов осуществления 7-9, где нацеливающаяся функциональная группа связывает геномный локус, содержащий по меньшей мере 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 нуклеотидов из последовательности GRCh37: chr8:129162465-129212140 на основании эталонного генома hg19.

11. Репрессор экспрессии согласно любому из вариантов осуществления 7-10, где нацеливающаяся функциональная группа связывает геномный локус, содержащий по меньшей мере 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 нуклеотидов из последовательности под SEQ ID NO: 96 или 108.

12. Репрессор экспрессии согласно любому из вариантов осуществления 7-11, где нацеливающаяся функциональная группа содержит домен по типу "цинкового пальца" или эффекторный домен TAL.

13. Репрессор экспрессии, содержащий

нацеливающуюся функциональную группу, которая связывает локус, например локус MYC,

первую эффекторную функциональную группу, содержащую EZH2 или его фрагмент или вариант, и

вторую эффекторную функциональную группу, содержащую KRAB или его фрагмент или вариант,

где репрессор экспрессии способен снижать уровень экспрессии в локусе, например снижать уровень экспрессии MYC.

14. Репрессор экспрессии согласно варианту осуществления 13, где нацеливающаяся функциональная группа связывает промотор MYC, область суперэнхансера или якорную последовательность.

15. Репрессор экспрессии согласно варианту осуществления 13 или 14, где нацеливающаяся функциональная группа содержит эффекторный домен TAL, домен CRISPR/Cas или домен по типу "цинкового пальца".

16. Репрессор экспрессии согласно любому из вариантов осуществления 13-15, где первая эффекторная функциональная группа находится на N-конце второго эффектора, или где первый эффектор находится на C-конце второй эффекторной функциональной группы.

17. Репрессор экспрессии, содержащий

нацеливающуюся функциональную группу, которая связывает локус MYC, где нацеливающаяся функциональная группа содержит домен по типу "цинкового пальца", и

необязательно эффекторную функциональную группу,

где репрессор экспрессии способен снижать уровень экспрессии MYC.

18. Репрессор экспрессии, содержащий

нацеливающуюся функциональную группу, содержащую домен CRISPR/Cas, например содержащую каталитически неактивный белок CRISPR/Cas, который

связывается с регуляторным элементом транскрипции (например, промотором, энхансером, суперэнхансером или сайтом начала транскрипции (TSS)), функционально связанным с геном MYC, или последовательностью, проксимальной по отношению к указанному регуляторному элементу транскрипции; и

эффекторную функциональную группу, содержащую MQ1 или ее функциональный вариант или фрагмент.

19. Репрессор экспрессии, содержащий

нацеливающуюся функциональную группу, содержащую домен CRISPR/Cas, например содержащую каталитически неактивный белок CRISPR/Cas, который связывается с регуляторным элементом транскрипции (например, промотором, энхансером или сайтом начала транскрипции (TSS)), функционально связанным с геном MYC, или последовательностью, проксимальной по отношению к указанному регуляторному элементу транскрипции; и

эффекторную функциональную группу, содержащую MQ1 или ее функциональный вариант или фрагмент.

20. Репрессор экспрессии, содержащий

нацеливающуюся функциональную группу, содержащую домен CRISPR/Cas, например содержащую каталитически неактивный белок CRISPR/Cas, который связывается с регуляторным элементом транскрипции (например, промотором, энхансером или сайтом начала транскрипции (TSS)), функционально связанным с геном MYC, или последовательностью, проксимальной по отношению к указанному регуляторному элементу транскрипции; и

эффекторную функциональную группу, содержащую KRAB или его функциональный вариант или фрагмент.

21. Репрессор экспрессии, содержащий

нацеливающуюся функциональную группу, содержащую домен CRISPR/Cas, например, содержащую каталитически неактивный белок CRISPR/Cas, который связывается с якорной последовательностью из объединения, опосредованного якорной последовательностью (ASMC), содержащего ген MYC, или последовательностью, проксимальной по отношению к якорной последовательности; и

эффекторную функциональную группу, содержащую KRAB или его функциональный вариант или фрагмент.

22. Репрессор экспрессии, содержащий

нацеливающуюся функциональную группу, содержащую домен по типу "цинкового пальца", который связывается с регуляторным элементом транскрипции (например, промотором, энхансером или сайтом начала транскрипции (TSS)), функционально связанным с геном MYC, или последовательностью, проксимальной по отношению к указанному регуляторному элементу транскрипции; и

эффекторную функциональную группу, содержащую MQ1 или ее функциональный вариант или фрагмент.

23. Репрессор экспрессии, содержащий

нацеливающуюся функциональную группу, содержащую домен по типу "цинкового пальца", который связывается с регуляторным элементом транскрипции (например, промотором, энхансером или сайтом начала транскрипции (TSS)), функционально связанным с геном MYC, или последовательностью, проксимальной по отношению к указанному регуляторному элементу транскрипции; и

эффекторную функциональную группу, содержащую KRAB или его функциональный вариант или фрагмент.

24. Репрессор экспрессии, содержащий

нацеливающуюся функциональную группу, которая связывает геномный локус мыши, содержащий по меньшей мере 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 нуклеотидов из последовательности под любым из SEQ ID NO: 190-192, и

необязательно эффекторную функциональную группу,

где репрессор экспрессии способен снижать уровень экспрессии MYC.

25. Репрессор экспрессии по пункту 24 формулы изобретения, где эффекторная функциональная группа содержит ДНК-метилтрансферазу, например MQ1, или ее фрагмент или вариант.

26. Репрессор экспрессии согласно вариантам осуществления 24 или 25, где нацеливающаяся функциональная группа содержит эффекторный домен TAL, домен CRISPR/Cas, домен по типу "цинкового пальца", домен tetR, мегануклеазный домен или олигонуклеотид.

27. Репрессор экспрессии согласно любому из вариантов осуществления 24-26, где нацеливающаяся функциональная группа содержит домен по типу "цинкового пальца" или эффекторный домен TAL.

28. Репрессор экспрессии согласно любому из вариантов осуществления 24-27, где репрессор экспрессии содержит аминокислотную последовательность, выбранную из любого из SEQ ID NO: 160-165, или последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 99 или 100% идентичностью с ней или имеет не более чем 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 положение, отличающееся от нее.

29. Репрессор экспрессии согласно любому из вариантов осуществления 24-28, где репрессор экспрессии кодируется нуклеотидной последовательностью, выбранной из любого из SEQ ID NO: 166-168, или последовательностью, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 99 или 100% идентичностью с ней или имеет не более чем 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 положение, отличающееся от нее.

30. Репрессор экспрессии согласно любому из вариантов осуществления 24-29, где нацеливающаяся функциональная группа содержит аминокислотную последовательность в соответствии с любым из SEQ ID NO: 154-156, или последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 99 или 100% идентичностью с ней или

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

31. Репрессор экспрессии согласно любому из вариантов осуществления 24-30, где нацеливающаяся функциональная группа содержит последовательность нуклеиновой кислоты в соответствии с любым из SEQ ID NO: 157-159, или последовательностью, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 99 или 100% идентичностью с ней или имеет не более чем 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 положение, отличающееся от нее.

32. Репрессор экспрессии согласно любому из вариантов осуществления 24-31, где эффекторная функциональная группа представляет собой устойчивую эффекторную функциональную группу.

33. Репрессор экспрессии согласно любому из вариантов осуществления 24-32, где эффекторная функциональная группа представляет собой неустойчивую эффекторную функциональную группу.

34. Репрессор экспрессии согласно любому из вариантов осуществления 24-33, где репрессор экспрессии представляет собой слитую молекулу.

35. Репрессор экспрессии согласно любому из вариантов осуществления 24-34, где нацеливающаяся функциональная группа содержит домен по типу "цинкового пальца", и эффекторная функциональная группа содержит эпигенетическую модифицирующую функциональную группу, например ДНК-метилтрансферазу, например MQ1, или ее фрагмент или вариант.

36. Репрессор экспрессии согласно любому из вариантов осуществления 18-20, 22 или 23, где регуляторный элемент представляет собой часть кластера регуляторных элементов.

37. Репрессор экспрессии согласно любому из вариантов осуществления 18-20, 22 или 23, где регуляторный элемент расположен в некодирующей области.

38. Репрессор экспрессии согласно любому из вариантов осуществления 18-20, 22 или 23, где регуляторный элемент представляет собой дистальный энхансер, например расположенный на расстоянии по меньшей мере 1000 нт от промотора гена-мишени, например, MYC.

39. Репрессор экспрессии согласно любому из вариантов осуществления 18-20, 22, 23 или 36-38, где регуляторный элемент повышает уровень экспрессии гена-мишени, например MYC.

40. Репрессор экспрессии согласно любому из вариантов осуществления 18-20, 22, 23 или 36-39, где регуляторный элемент содержит одну или несколько мутаций.

41. Репрессор экспрессии согласно любому из вариантов осуществления 18-20, 22, 23 или 36-40, где регуляторный элемент содержит по меньшей мере один ассоциированный с заболеванием однонуклеотидный полиморфизм (SNP).

42. Репрессор экспрессии согласно любому из вариантов осуществления 18-20, 22, 23 или 36-41, где регуляторный элемент транскрипции взаимодействует с промотором

гена-мишени, например MYC, посредством сайта стыковки энхансера.

43. Репрессор экспрессии согласно варианту осуществления 42, где сайт стыковки энхансера содержит нуклеотидную последовательность в соответствии с любым из SEQ ID NO: 71-74.

44. Репрессор экспрессии, содержащий

нацеливающуюся функциональную группу, содержащую домен по типу "цинкового пальца", который связывается с якорной последовательностью из объединения, опосредованного якорной последовательностью (ASMC), содержащего ген MYC, или последовательностью, проксимальной по отношению к якорной последовательности; и

эффекторную функциональную группу, содержащую KRAB или его функциональный вариант или фрагмент.

45. Репрессор экспрессии согласно любому из вариантов осуществления 1-23 или 36-43, где репрессор экспрессии содержит аминокислотную последовательность, выбранную из любого из SEQ ID NO: 22-37, 129, 133, 134, 139-149 или 177-186, или последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 99 или 100% идентичностью с ней или имеет не более чем 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 положение, отличающееся от нее.

46. Репрессор экспрессии согласно любому из вариантов осуществления 1-23 или 36-45, где репрессор экспрессии кодируется нуклеотидной последовательностью, выбранной из любого из SEQ ID NO: 55-70, 130, 189 или 193-197, или последовательностью, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 99 или 100% идентичностью с ней или имеет не более чем 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 положение, отличающееся от нее.

47. Репрессор экспрессии согласно любому из вариантов осуществления 1-23 или 36-46, где нацеливающаяся функциональная группа содержит аминокислотную последовательность в соответствии с любым из SEQ ID NO: 5-16 или 169-172 или последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 99 или 100% идентичностью с ней или имеет не более чем 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 положение, отличающееся от нее.

48. Репрессор экспрессии согласно любому из предыдущих вариантов осуществления, где эффекторная функциональная группа содержит аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 18, 19 или 87 или последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 99 или 100% идентичностью с ней или имеет не более чем 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 положение, отличающееся от нее.

49. Репрессор экспрессии согласно любому из вариантов осуществления 1-12, 17-19, 22, 36-42 или 44-47, где эффекторная функциональная группа представляет собой устойчивую эффекторную функциональную группу.

50. Репрессор экспрессии согласно любому из вариантов осуществления 1-23 или

36-48, где эффекторная функциональная группа представляет собой неустойчивую эффекторную функциональную группу.

51. Репрессор экспрессии согласно любому из вариантов осуществления 1-12, 17-19, 22, 36-42 или 44-48, где эффекторная функциональная группа содержит ДНК-метилтрансферазу, например MQ1, или ее фрагмент или вариант.

52. Репрессор экспрессии согласно любому из вариантов осуществления 1-23, 36-47 или 49, где эффекторная функциональная группа содержит репрессор транскрипции, например содержит KRAB или его фрагмент или вариант.

53. Репрессор экспрессии согласно любому из предыдущих вариантов осуществления, где нацеливающаяся функциональная группа содержит эффекторный домен TAL, домен CRISPR/Cas, домен по типу "цинкового пальца", домен tetR, мегануклеазный домен или олигонуклеотид.

54. Репрессор экспрессии согласно варианту осуществления 53, где домен CRISPR/Cas связывает gRNA, например gRNA, которая связывает геномный локус, содержащий по меньшей мере 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 нуклеотидов из последовательности под любым из SEQ ID NO: 1-4, например, где gRNA содержит последовательность, которая содержит по меньшей мере 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 нуклеотидов из последовательности под любым из SEQ ID NO: 1-4.

55. Репрессор экспрессии согласно варианту осуществления 53, где домен CRISPR/Cas связывает gRNA, например gRNA, которая связывает геномный локус, содержащий по меньшей мере 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 нуклеотидов из последовательности под любым из SEQ ID NO: 96-110, например, где gRNA содержит последовательность, которая содержит по меньшей мере 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 нуклеотидов из последовательности под любым из SEQ ID NO: 96-110.

56. Репрессор экспрессии согласно любому из вариантов осуществления 53-55, где домен CRISPR/Cas содержит белок Cas или белок Cpf1, выбранные из таблицы 1, или вариант (например, мутантный) любого из них.

57. Репрессор экспрессии согласно любому из вариантов осуществления 53-56, где домен CRISPR/Cas содержит каталитически неактивный белок CRISPR/Cas, например dCas9.

58. Репрессор экспрессии согласно варианту осуществления 53, где домен по типу "цинкового пальца" связывает геномный локус, содержащий по меньшей мере 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 нуклеотидов из последовательности под любым из SEQ ID NO: 96-110, например, где gRNA содержит последовательность, которая содержит по меньшей мере 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 нуклеотидов из последовательности под любым из SEQ ID NO: 96-110.

59. Репрессор экспрессии согласно любому из вариантов осуществления 17, 22, 26-53 или 57, где домен по типу "цинкового пальца" содержит 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 "цинковых пальцев" (и необязательно не более 11, 10, 9, 8, 7, 6 или 5 "цинковых пальцев").

60. Репрессор экспрессии согласно любому из вариантов осуществления 17, 22, 26-

53, 57 или 58, где домен по типу "цинкового пальца" содержит 1-10, 1-9, 1-8, 1-7, 1-6, 1-5, 1-4, 1-3, 1-2, 2-10, 2-9, 2-8, 2-7, 2-6, 2-5, 2-4, 2-3, 3-10, 3-9, 3-8, 3-7, 3-6, 3-5, 3-4, 4-10, 4-9, 4-8, 4-7, 4-6, 4-5, 5-10, 5-9, 5-8, 5-7, 5-6, 6-10, 6-9, 6-8, 6-7, 7-10, 7-9, 7-8, 8-10, 8-9, или 9-10 "цинковых пальцев".

61. Репрессор экспрессии согласно любому из вариантов осуществления 17, 22, 26-53 или 57-59, где домен по типу "цинкового пальца" содержит 3 или 9 "цинковых пальцев".

62. Репрессор экспрессии согласно любому из предыдущих вариантов осуществления, который представляет собой слитую молекулу.

63. Репрессор экспрессии согласно любому из предыдущих вариантов осуществления, который содержит линкер, расположенный между нацеливающимся доменом и эффекторным доменом, где необязательно линкер содержит аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 137 или SEQ ID NO: 138.

64. Репрессор экспрессии согласно любому из вариантов осуществления 1-17, 20, 21, 23, 44-48, 50 или 52-57, где нацеливающаяся функциональная группа содержит каталитически неактивный домен CRISPR/Cas (например, dCas9), и эффекторная функциональная группа содержит репрессор транскрипции, например KRAB или его фрагмент или вариант.

65. Репрессор экспрессии согласно любому из вариантов осуществления 1-17, 20, 21, 23, 44-48, 50, 52 или 53-64, где нацеливающаяся функциональная группа содержит домен по типу "цинкового пальца", и эффекторная функциональная группа содержит репрессор транскрипции, например KRAB или его фрагмент или вариант.

66. Репрессор экспрессии согласно любому из вариантов осуществления 17, 36-43, 45-47, 53 или 58-63, где нацеливающаяся функциональная группа содержит домен по типу "цинкового пальца", и репрессор экспрессии не содержит эффекторную функциональную группу.

67. Репрессор экспрессии согласно любому из вариантов осуществления 1-12, 18-19, 22, 36-43, 45-49, 51 или 53-57, где нацеливающаяся функциональная группа содержит каталитически неактивный домен CRISPR/Cas (например, dCas9), и эффекторная функциональная группа содержит эпигенетическую модифицирующую функциональную группу, например ДНК-метилтрансферазу, например MQ1, или ее фрагмент или вариант.

68. Репрессор экспрессии согласно любому из вариантов осуществления 1-12, 17-19, 22, 36-43, 45-49, 51, 53 или 58-63, где нацеливающаяся функциональная группа содержит домен по типу "цинкового пальца", и эффекторная функциональная группа содержит эпигенетическую модифицирующую функциональную группу, например ДНК-метилтрансферазу, например MQ1, или ее фрагмент или вариант.

69. Репрессор экспрессии согласно любому из предыдущих вариантов осуществления, который содержит аминокислотную последовательность в соответствии с любым из SEQ ID NO: 22-37, 129, 133, 134, 139-149 или 177-186 или последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%

идентичностью с ней.

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

71. Репрессор экспрессии согласно любому из предыдущих вариантов осуществления, содержащий первую NLS на N-конце, например, где первая NLS имеет последовательность под SEQ ID NO: 88.

72. Репрессор экспрессии согласно любому из предыдущих вариантов осуществления, содержащий NLS, например вторую NLS, на C-конце, например, с последовательностью под SEQ ID NO: 89.

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

74. Репрессор экспрессии согласно любому из вариантов осуществления 71-73, где первая и вторая NLS имеют отличающиеся последовательности.

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

76. Репрессор экспрессии согласно варианту осуществления 75, где эпитопная метка представляет собой HA-метку.

77. Репрессор экспрессии согласно любому из предыдущих вариантов осуществления, где якорная последовательность содержит последовательность под SEQ ID NO: 71 или 72 или последовательность, которая характеризуется не более чем 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 изменением относительно нее.

78. Репрессор экспрессии согласно любому из вариантов осуществления 1-77, где якорная последовательность содержит последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 73 или 74 или последовательность, которая характеризуется не более чем 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 изменением относительно нее.

79. Репрессор экспрессии согласно любому из предыдущих вариантов осуществления, где якорная последовательность находится в той же хромосоме, что и ген MYC.

80. Репрессор экспрессии согласно любому из предыдущих вариантов осуществления, где якорная последовательность расположена выше гена MYC (например, выше TSS или выше промотора).

81. Репрессор экспрессии согласно любому из предыдущих вариантов осуществления, где якорная последовательность удалена на по меньшей мере 1, 5, 10, 50, 100 или 1000 тысяч пар оснований от гена MYC (например, от TSS или промотора гена MYC).

82. Репрессор экспрессии согласно любому из предыдущих вариантов осуществления, где якорная последовательность удалена на 0,1-0,5, 0,1-1, 0,1-5, 0,1-10, 0,1-50, 0,1-100, 0,1-500, 0,1-1000, 0,5-1, 0,5-5, 0,5-10, 0,5-50, 0,5-100, 0,5-500, 0,5-1000, 1-5, 1-10, 1-50, 1-100, 1-500, 1-1000, 5-10, 5-50, 5-100, 5-500, 5-1000, 10-50, 10-100, 10-500, 10-

1000, 50-100, 50-500, 50-1000, 100-500, 100-1000, или 500-1000 тысяч пар оснований от гена MYC (например, от TSS или промотора гена MYC).

83. Репрессор экспрессии согласно любому из вариантов осуществления 1-79 или 81-82, где последовательность-мишень расположена ниже гена MYC (например, ниже TSS или ниже промотора).

84. Репрессор экспрессии согласно любому из предыдущих вариантов осуществления, где нацеливающаяся функциональная группа связывается с последовательностью с хромосомными координатами 128746342-128746364, 128746321-128746343, 128746525-128746547, 128748014-128748036, 129188878-129188900, 129188958-129188980, 129188960-129188982, 129189067-129189089, 129189457-129189479, 129189554-129189576, 129189679-129189701, 129209511-129209533, 129209643-129209665, 129209658-129209680, 129209856-129209878, 129189452-129189474, 129189190-129189212, 129189274-129189296, 129189421-129189443, 128746405-128746425, 128748069-128748089, 129188825-129188845 или 129188822-129188842 или последовательностью, проксимальной по отношению к ней.

85. Репрессор экспрессии согласно любому из предыдущих вариантов осуществления, где связывание репрессора экспрессии с локусом гена-мишени, например MYC, увеличивает степень метилирования в сайте локуса гена-мишени, например MYC, на 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100% по сравнению со степенью метилирования в отсутствие репрессора экспрессии, например, при измерении посредством ELISA или как описано в любом из примеров 7 или 28, где, необязательно, анализируемый сайт метилирования представляет собой chr8:129188693-129189048 в соответствии с эталонным геномом hg19, например содержит последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 123.

86. Репрессор экспрессии согласно любому из предыдущих вариантов осуществления, где связывание репрессора экспрессии с локусом гена-мишени, например MYC, увеличивает степень метилирования в сайте локуса гена-мишени, например MYC, на период времени, составляющий по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25 дней или по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 клеточных делений, например, как описано в примере 28.

87. Репрессор экспрессии согласно любому из предыдущих вариантов осуществления, где связывание репрессора экспрессии с локусом MYC снижает уровень экспрессии MYC в клетке на 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100% по сравнению с экспрессией в отсутствие репрессора экспрессии, например, при измерении посредством ELISA или как описано в любом из примеров 2-7 или 9.

88. Репрессор экспрессии согласно любому из предыдущих вариантов осуществления, где связывание репрессора экспрессии с локусом MYC в значительной степени снижает уровень экспрессии MYC на период времени, составляющий по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 , 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25 дней или по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 клеточных делений, например, при

измерении посредством ELISA или как описано в любом из примеров 2-7 или 9.

89. Репрессор экспрессии согласно любому из предыдущих вариантов осуществления, где связывание репрессора экспрессии с локусом MYC в значительной степени снижает уровень экспрессии MYC через 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36, 40, 44 , 48, 52, 56, 60, 64, 68, 72, 76, 80 или 96 часов после трансфекции.

90. Репрессор экспрессии согласно любому из вариантов осуществления 1-23 или 36-89, где нацеливающаяся функциональная группа связывается с геномным локусом человека.

91. Репрессор экспрессии согласно любому из вариантов осуществления 24-43, 49, 51, 53, 56-57, 59-62, 66-68, 70-89, где нацеливающаяся функциональная группа связывается с геномным локусом мыши.

92. Репрессор экспрессии согласно любому из предыдущих вариантов осуществления, где связывание репрессора экспрессии с локусом MYC снижает жизнеспособность клетки, содержащей локус MYC (например, раковых клеток).

93. Репрессор экспрессии согласно любому из предыдущих вариантов осуществления, где приведение множества клеток в контакт с репрессором экспрессии или нуклеиновой кислотой, кодирующей репрессор экспрессии, снижает жизнеспособность множества клеток.

94. Репрессор экспрессии согласно любому из предыдущих вариантов осуществления, где жизнеспособность снижается на 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100% по сравнению с жизнеспособностью в отсутствие первого репрессора экспрессии, например, при измерении посредством CellTiter Glo или как описано в любом из примеров 2-7.

95. Репрессор экспрессии согласно любому из предыдущих вариантов осуществления, где введение репрессора экспрессии приводит к апоптозу по меньшей мере 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 12%, 15%, 17%, 20%, 25% 30%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 75% клеток-мишеней (например, раковых клеток).

96. Репрессор экспрессии согласно любому из предыдущих вариантов осуществления, где множество клеток предусматривает множество раковых клеток и множество нераковых клеток и/или множество инфицированных клеток и множество неинфицированных клеток.

97. Репрессор экспрессии согласно любому из предыдущих вариантов осуществления, где приведение множества клеток в контакт с репрессором экспрессии или нуклеиновой кислотой, кодирующей репрессор экспрессии, снижает жизнеспособность множества раковых клеток в большей степени, чем жизнеспособность множества нераковых клеток.

98. Репрессор экспрессии согласно любому из предыдущих вариантов осуществления, где приведение множества клеток в контакт с репрессором экспрессии или нуклеиновой кислотой, кодирующей репрессор экспрессии, снижает жизнеспособность множества раковых клеток в 1,05x (т. е. в 1,05 раза), 1,1x, 1,15x, 1,2x,

1,25x, 1,3x, 1,35x, 1,4x, 1,45x, 1,5x, 1,6x, 1,7x, 1,8x, 1,9x, 2x, 3x, 4x, 5x, 6x, 7x, 8x, 9x, 10x, 20x, 50x, или 100x больше, чем жизнеспособность множества нераковых клеток.

99. Репрессор экспрессии согласно любому из вариантов осуществления 92-97, где раковые клетки представляют собой раковые клетки легкого, раковые клетки желудка, раковые клетки желудочно-кишечного тракта, колоректальные раковые клетки, раковые клетки поджелудочной железы или раковые клетки печени.

100. Репрессор экспрессии согласно любому из вариантов осуществления 92-99, где рак представляет собой гепатоклеточную карциному (HCC), фиброламеллярную гепатоклеточную карциному (FHCC), холангиокарциному, ангиосаркому, вторичный рак печени, немелкоклеточный рак легкого (NSCLC), аденокарциному, мелкоклеточный рак легкого (SCLC), крупноклеточную (недифференцированную) карциному, трижды негативный рак молочной железы, аденокарциному желудка, карциному эндометрия или карциному поджелудочной железы.

101. Репрессор экспрессии согласно любому из предыдущих вариантов осуществления, который при приведении в контакт с множеством инфицированных клеток и множеством неинфицированных клеток снижает жизнеспособность множества инфицированных клеток больше, чем он снижает жизнеспособность множества неинфицированных клеток.

102. Репрессор экспрессии согласно любому из предыдущих вариантов осуществления, где инфекция имеет вирусную природу.

103. Репрессор экспрессии согласно варианту осуществления 102, где вирусная инфекция представляет собой гепатит, например гепатит B.

104. Репрессор экспрессии согласно любому из вариантов осуществления 92-103, где инфицированные клетки представляют собой гепатоциты человека.

105. Репрессор экспрессии согласно любому из предыдущих вариантов осуществления, который характеризуется EC50, составляющей 0,04-0,4, 0,04-0,1, 0,1-0,2, 0,2-0,3 или 0,3-0,4 мкг/мл, при тестировании в анализе в отношении жизнеспособности раковых клеток (например, клеток HCC) с помощью доставки посредством LNP mRNA, кодирующей репрессор экспрессии, например, в анализе согласно примеру 12.

106. Репрессор экспрессии согласно любому из вариантов осуществления 1-104, который характеризуется EC50, составляющей 0,1-2,5, 0,5-2,2, 1,0-1,5, 1,2-2 мкг/мл, при тестировании в анализе в отношении жизнеспособности раковых клеток (например, клеток рака легких) с помощью доставки посредством LNP mRNA, кодирующей репрессор экспрессии, например, в анализе согласно примеру 18.

107. Репрессор экспрессии согласно любому из предыдущих вариантов осуществления, который характеризуются EC50, составляющей 0,004-0,08, 0,004-0,01, 0,01-0,02, 0,02-0,04 или 0,04-0,08 мкг/мл, при тестировании в анализе в отношении снижения уровней mRNA MYC в раковых клетках (например, клетках HCC) с помощью доставки посредством LNP mRNA, кодирующей репрессор экспрессии, например, в анализе согласно примеру 12.

108. Репрессор экспрессии согласно любому из предыдущих вариантов осуществления, который характеризуются EC50, составляющей 0,04-0,1, 0,04-0,09, 0,05-0,09 или 0,06-0,8 мкг/мл, при тестировании в анализе на снижение уровней mRNA MYC в раковых клетках (например, раковых клетках легкого) с помощью доставки посредством LNP mRNA, кодирующей репрессор экспрессии, например, в анализе согласно примеру 18.

109. Репрессор экспрессии согласно любому из предыдущих вариантов осуществления, который снижает уровень белка, кодируемого геном-мишенью, например MYC, в клетке на по меньшей мере 10%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80% или по меньшей мере 90% по сравнению с уровнем белка в необработанной клетке.

110. Репрессор экспрессии согласно любому из предыдущих вариантов осуществления, который способен уменьшать объем опухоли, например, у субъекта-человека или в модели млекопитающего.

111. Репрессор экспрессии согласно любому из предыдущих вариантов осуществления, где репрессор экспрессии способен уменьшать объем опухоли в такой же или большей степени по сравнению с химиотерапевтическим средством, например, в модели млекопитающего, например, при измерении через 20 дней после начала обработки, например, где репрессор экспрессии вводят каждые 5 дней в дозе 3 мг/кг.

112. Репрессор экспрессии согласно любому из предыдущих вариантов осуществления, где репрессор экспрессии способен уменьшать объем опухоли по сравнению с контролем с PBS, например, в модели млекопитающего, например, при измерении через 20 дней после начала обработки, например, где репрессор экспрессии вводят каждые 5 дней в течение 4 доз, а затем каждые 3 дня в течение 3 доз по 1 мг/кг, 1,5 мг/кг или 3 мг/кг.

113. Репрессор экспрессии согласно любому из предыдущих вариантов осуществления, где объем опухоли уменьшается на по меньшей мере приблизительно 10%, 20%, 30% или 40% по сравнению с контролем, обработанным PBS, например, через 20 дней после начала обработки.

114. Репрессор экспрессии согласно любому из вариантов осуществления 111-113, где химиотерапевтическое средство представляет собой сорафениб или цисплатин.

115. Репрессор экспрессии согласно любому из предыдущих вариантов осуществления, где система способна уменьшать объем опухоли в такой же или большей степени по сравнению с низкомолекулярным ингибитором MYC.

116. Репрессор экспрессии согласно варианту осуществления 115, где низкомолекулярный ингибитор MYC представляет собой MYCi975, где, необязательно, объем опухоли уменьшается на по меньшей мере приблизительно 10%, 20%, 30% или 40% по сравнению с контролем, обработанным MYCi975, например, через 20 дней после начала обработки.

117. Репрессор экспрессии согласно любому из предыдущих вариантов осуществления, который не вызывает снижения веса тела по сравнению с началом обработки или вызывает снижение веса тела на менее чем 3%, 2% или 1%.

118. Система, содержащая

первый репрессор экспрессии согласно любому из предыдущих вариантов осуществления и

второй репрессор экспрессии, например второй репрессор экспрессии, описанный в данном документе, например второй репрессор экспрессии согласно любому из предыдущих вариантов осуществления.

119. Система, содержащая

первый репрессор экспрессии, содержащий первую нацеливающуюся функциональную группу и, необязательно, первую эффекторную функциональную группу, где первый репрессор экспрессии связывается с регуляторным элементом транскрипции (например, промотором, энхансером или сайтом начала транскрипции (TSS)), функционально связанным с геном MYC, или последовательностью, проксимальной по отношению к регуляторному элементу транскрипции; и

второй репрессор экспрессии, содержащий вторую нацеливающуюся функциональную группу и необязательно вторую эффекторную функциональную группу, где второй репрессор экспрессии связывается с якорной последовательностью из объединения, опосредованного якорной последовательностью (ASMC), содержащего ген MYC, или последовательностью, проксимальной по отношению к якорной последовательности.

120. Система согласно варианту осуществления 118 или 119,

где регуляторный элемент транскрипции содержит промотор, и

где якорная последовательность содержит CTCF-связывающий мотив.

121. Система согласно любому из вариантов осуществления 118-120, где второй репрессор экспрессии связывается с расположенной ниже областью, прилегающей к CTCF-связывающему мотиву.

122. Система согласно любому из вариантов осуществления 118-120, где второй репрессор экспрессии связывается с расположенной выше областью, прилегающей к CTCF-связывающему мотиву.

123. Система согласно любому из вариантов осуществления 118-122, где

первый репрессор экспрессии содержит нацеливающуюся функциональную группу, которая связывает геномный локус, содержащий по меньшей мере 16, 17, 18, 19 или 20 нуклеотидов из последовательности под SEQ ID NO: 2, 3, 4, 71-86 или 200-206; и

второй репрессор экспрессии содержит нацеливающуюся функциональную группу, которая связывает геномный локус, содержащий по меньшей мере 16, 17, 18, 19 или 20 нуклеотидов из последовательности под SEQ ID NO: 2, 3, 4, 71-86 или 200-206.

124. Система согласно любому из вариантов осуществления 118-123, где

первый репрессор экспрессии содержит нацеливающуюся функциональную

группу, которая связывает геномный локус, содержащий по меньшей мере 16, 17, 18, 19 или 20 нуклеотидов из последовательности под любым из SEQ ID NO: 96-110.

125. Система согласно любому из вариантов осуществления 118-124, где

первый репрессор экспрессии содержит нацеливающуюся функциональную группу, которая связывает геномный локус, содержащий по меньшей мере 16, 17, 18, 19 или 20 нуклеотидов из последовательности под SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 72 или SEQ ID NO: 83; и

второй репрессор экспрессии содержит нацеливающуюся функциональную группу, которая связывает геномный локус, содержащий по меньшей мере 16, 17, 18, 19 или 20 нуклеотидов из последовательности под SEQ ID NO: 77.

126. Система, содержащая

первый репрессор экспрессии, содержащий первую нацеливающуюся функциональную группу и необязательно первую эффекторную функциональную группу, где первый репрессор экспрессии связывается с промотором, функционально связанным с геном MYC, или последовательностью, проксимальной по отношению промотору, и

второй репрессор экспрессии, содержащий вторую нацеливающуюся функциональную группу и необязательно вторую эффекторную функциональную группу, где второй репрессор экспрессии связывается с энхансером (например, суперэнхансером) гена MYC.

127. Система согласно варианту осуществления 126, где

первый репрессор экспрессии содержит нацеливающуюся функциональную группу, которая связывает геномный локус, содержащий по меньшей мере 16, 17, 18, 19 или 20 нуклеотидов из последовательности под SEQ ID NO: 204, и

второй репрессор экспрессии содержит нацеливающуюся функциональную группу, которая связывает геномный локус, содержащий по меньшей мере 16, 17, 18, 19 или 20 нуклеотидов из последовательности под любым из SEQ ID NO: 199 или 201.

128. Система для снижения уровня экспрессии MYC, при этом система содержит

a) первый репрессор экспрессии, содержащий

i) первую нацеливающуюся функциональную группу, содержащую аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 13 или последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 99 или 100% идентичностью с ней или имеет не более чем 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 положение, отличающееся от нее, и

ii) первую эффекторную функциональную группу, содержащую аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 19 или 87 или последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 99 или 100% идентичностью с ней или имеет не более чем 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 положение, отличающееся от нее, и

b) второй репрессор экспрессии, содержащий

i) вторую нацеливающуюся функциональную группу, содержащую

аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 7, 169 или 171 или последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 99 или 100% идентичностью с ней или имеет не более чем 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 положение, отличающееся от нее, и

ii) вторую эффекторную функциональную группу, содержащую аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO:18 или последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 99 или 100% идентичностью с ней или имеет не более чем 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 положение, отличающееся от нее.

129. Система согласно вариантам осуществления 128, где первый репрессор экспрессии дополнительно содержит первый сигнал ядерной локализации, например NLS SV40, например последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 135 или последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 99 или 100% идентичностью с ней, например, расположенной на N-конце первой нацеливающейся функциональной группы.

130. Система согласно варианту осуществления 128 или 129, где первый репрессор экспрессии дополнительно содержит второй сигнал ядерной локализации, например NLS нуклеоплазмина, например, последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 136 или последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 99 или 100% идентичностью с ней, например, расположенную на C-конце первой эффекторной функциональной группы.

131. Система согласно любому из вариантов осуществления 128-130, где первый репрессор экспрессии дополнительно содержит первый сигнал ядерной локализации, например NLS SV40, например, последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 135 или последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 99 или 100% идентичностью с ней, например, расположенную на N-конце второй нацеливающейся функциональной группы.

132. Система согласно любому из вариантов осуществления 128-131, где первый репрессор экспрессии дополнительно содержит второй сигнал ядерной локализации, например NLS нуклеоплазмина, например, последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 136 или последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 99 или 100% идентичностью с ней, например, расположенную на C-конце второй эффекторной функциональной группы.

133. Система согласно любому из вариантов осуществления 128-132, где первый репрессор экспрессии дополнительно содержит первый линкер, расположенный между первой нацеливающейся функциональной группой и первой эффекторной функциональной группой, где необязательно первый линкер имеет аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 137 или последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 99 или 100% идентичностью с ней.

134. Система согласно любому из вариантов осуществления 128-133, где второй

репрессор экспрессии дополнительно содержит второй линкер, расположенный между второй нацеливающейся функциональной группой и второй эффекторной функциональной группой, где, необязательно, второй линкер имеет аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 138 или последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 99 или 100% идентичностью с ней.

135. Система согласно любому из вариантов осуществления 128-134, где первый репрессор экспрессии дополнительно содержит аминокислотную последовательность, расположенную на С-конце первой эффекторной функциональной группы, например последовательность длиной до 30, 25, 20 или 18 аминокислот, например, последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 126 или последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 99 или 100% идентичностью с ней.

136. Система согласно любому из вариантов осуществления 128-132, где второй репрессор экспрессии дополнительно содержит аминокислотную последовательность, расположенную на N-конце второй нацеливающейся функциональной группы, например последовательность длиной до 30, 25, 20 или 18 аминокислот, например, последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 128 или последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 99 или 100% идентичностью с ней.

137. Система согласно любому из вариантов осуществления 128-136, где первый репрессор экспрессии имеет аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 30 или 129 или последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 99 или 100% идентичностью с ней.

138. Система согласно любому из вариантов осуществления 128-137, где второй репрессор экспрессии содержит аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 24 или последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 99 или 100% идентичностью с ней.

139. Система согласно любому из вариантов осуществления 128-137, где вторая нацеливающаяся функциональная группа содержит аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 169 или последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 99 или 100% идентичностью с ней.

140. Система согласно любому из вариантов осуществления 128-137, где вторая нацеливающаяся функциональная группа содержит аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 171 или последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 99 или 100% идентичностью с ней.

141. Система согласно любому из вариантов осуществления 128-140, где второй репрессор экспрессии содержит аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 177 или 183 или последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 99 или 100% идентичностью с ней.

142. Система согласно любому из вариантов осуществления 128-140, где второй репрессор экспрессии содержит аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 179, 185 или последовательность, которая характеризуется по меньшей мере

80, 85, 90, 95, 99 или 100% идентичностью с ней.

143. Нуклеиновая кислота, кодирующая первый репрессор экспрессии и второй репрессор системы согласно любому из вариантов осуществления 128-142.

144. Нуклеиновая кислота, кодирующая систему для снижения уровня экспрессии MYC, при этом нуклеиновая кислота содержит

a) первую область, кодирующую первый репрессор экспрессии, при этом первый репрессор экспрессии содержит

i) первую нацеливающуюся функциональную группу, содержащую аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 13 или последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 99 или 100% идентичностью с ней или имеет не более чем 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 положение, отличающееся от нее, и

ii) первую эффекторную функциональную группу, содержащую аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 19 или 87 или последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 99 или 100% идентичностью с ней или имеет не более чем 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 положение, отличающееся от нее, и

b) вторую область, кодирующую второй репрессор экспрессии, при этом второй репрессор экспрессии содержит

i) вторую нацеливающуюся функциональную группу, содержащую аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 7 или последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 99 или 100% идентичностью с ней или имеет не более чем 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 положение, отличающееся от нее, и

ii) вторую эффекторную функциональную группу, содержащую аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO:18 или последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 99 или 100% идентичностью с ней или имеет не более чем 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 положение, отличающееся от нее.

145. Нуклеиновая кислота согласно варианту осуществления 144, где первая область расположена на 5'-конце относительно второй области.

146. Нуклеиновая кислота согласно варианту осуществления 144, где первая область расположена на 3'-конце относительно второй области.

147. Нуклеиновая кислота согласно варианту осуществления 145 или 146, где первая область дополнительно содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую первый сигнал ядерной локализации, например NLS SV40, например последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 135 или последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 99 или 100% идентичностью с ней, например, расположенной на N-конце первой нацеливающейся функциональной группы.

148. Нуклеиновая кислота по любому из вариантов осуществления 145-147, где

первая область дополнительно содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую второй сигнал ядерной локализации, например NLS нуклеоплазмина, например последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 136 или последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 99 или 100% идентичностью с ней, например, расположенную на С-конце первой эффекторной функциональной группы.

149. Нуклеиновая кислота согласно любому из вариантов осуществления 145-148, где вторая область дополнительно содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую первый сигнал ядерной локализации, например NLS SV40, например последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 135 или последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 99 или 100% идентичностью с ней, например, расположенную на N-конце второй нацеливающейся функциональной группы.

150. Нуклеиновая кислота согласно любому из вариантов осуществления 145-149, где вторая область дополнительно содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую второй сигнал ядерной локализации, например NLS нуклеоплазмина, например последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 136 или последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 99 или 100% идентичностью с ней, например, расположенную на С-конце второй эффекторной функциональной группы.

151. Нуклеиновая кислота согласно любому из вариантов осуществления 145-150, где первая область дополнительно содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую первый линкер, расположенный между первой нацеливающейся функциональной группой и первой эффекторной функциональной группой, где необязательно первый линкер имеет аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 137 или последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 99 или 100% идентичностью с ней.

152. Нуклеиновая кислота согласно любому из вариантов осуществления 145-151, где вторая область дополнительно содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую второй линкер, расположенный между второй нацеливающейся функциональной группой и второй эффекторной функциональной группой, где необязательно второй линкер имеет аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 138 или последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 99 или 100% идентичностью с ней.

153. Нуклеиновая кислота согласно любому из вариантов осуществления 145-152, где первая область дополнительно содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность, расположенную на С-конце первой эффекторной функциональной группы, например последовательность длиной 30, 25, 20 или 18 аминокислот, например, последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 126 или последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 99 или 100% идентичностью с ней.

154. Нуклеиновая кислота согласно любому из вариантов осуществления 145-153, где вторая область дополнительно содержит нуклеотидную последовательность,

кодирующую аминокислотную последовательность, расположенную на N-конце второй нацеливающейся функциональной группы, например последовательность длиной 30, 25, 20 или 18 аминокислот, например, последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 128 или последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 99 или 100% идентичностью с ней.

155. Нуклеиновая кислота согласно любому из вариантов осуществления 145-154, где первый репрессор экспрессии содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 30 или 129 или последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 99 или 100% идентичностью с ней.

156. Нуклеиновая кислота согласно любому из вариантов осуществления 145-155, где второй репрессор экспрессии содержит аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 24 или последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 99 или 100% идентичностью с ней.

157. Нуклеиновая кислота согласно любому из вариантов осуществления 145-156, где первая область содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую первую нацеливающуюся функциональную группу, где нуклеотидная последовательность, кодирующая первую нацеливающуюся функциональную группу, содержит последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 46 или 131 или последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 99 или 100% идентичностью с ней или имеет не более чем 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 положение, отличающееся от нее.

158. Нуклеиновая кислота согласно любому из вариантов осуществления 145-157, где первая область содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую первую эффекторную функциональную группу, где нуклеотидная последовательность, кодирующая первую эффекторную функциональную группу, содержит последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 52 или 132 или последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 99 или 100% идентичностью с ней или имеет не более чем 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 положение, отличающееся от нее.

159. Нуклеиновая кислота согласно любому из вариантов осуществления 145-158, где вторая область содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую вторую нацеливающуюся функциональную группу, где нуклеотидная последовательность, кодирующая вторую нацеливающуюся функциональную группу, содержит последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 40 или последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 99 или 100% идентичностью с ней или имеет не более чем 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 положение, отличающееся от нее.

160. Нуклеиновая кислота согласно любому из вариантов осуществления 145-159, где первая область содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую первую эффекторную функциональную группу, где нуклеотидная последовательность,

кодирующая первую эффекторную функциональную группу, содержит последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 51 или последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 99 или 100% идентичностью с ней или имеет не более чем 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 положение, отличающееся от нее.

161. Нуклеиновая кислота согласно любому из вариантов осуществления 145-160, где первая область содержит нуклеотидную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 63 или 130 или последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 99 или 100% идентичностью с ней или имеет не более чем 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 положение, отличающееся от нее, где поли-А-последовательность является необязательной.

162. Нуклеиновая кислота согласно любому из вариантов осуществления 145-161, где вторая область содержит нуклеотидную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 57 или последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 99 или 100% идентичностью с ней или имеет не более чем 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 положение, отличающееся от нее, где поли-А-последовательность является необязательной.

163. Нуклеиновая кислота, кодирующая систему для снижения уровня экспрессии MYC, при этом нуклеиновая кислота содержит

a) первую область, кодирующую первый репрессор экспрессии, при этом первый репрессор экспрессии содержит

i) первую нацеливающуюся функциональную группу, содержащую аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 13 или последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 99 или 100% идентичностью с ней или имеет не более чем 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 положение, отличающееся от нее, и

ii) первую эффекторную функциональную группу, содержащую аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 19 или 87 или последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 99 или 100% идентичностью с ней или имеет не более чем 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 положение, отличающееся от нее, и

b) вторую область, кодирующую второй репрессор экспрессии, при этом второй репрессор экспрессии содержит

i) вторую нацеливающуюся функциональную группу, содержащую аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO:169 или последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 99 или 100% идентичностью с ней или имеет не более чем 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 положение, отличающееся от нее, и

ii) вторую эффекторную функциональную группу, содержащую аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO:18 или последовательность, которая

характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 99 или 100% идентичностью с ней или имеет не более чем 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 положение, отличающееся от нее.

164. Нуклеиновая кислота, кодирующая систему для снижения уровня экспрессии MYC, при этом нуклеиновая кислота содержит

a) первую область, кодирующую первый репрессор экспрессии, при этом первый репрессор экспрессии содержит

i) первую нацеливающуюся функциональную группу, содержащую аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 13 или последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 99 или 100% идентичностью с ней или имеет не более чем 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 положение, отличающееся от нее, и

ii) первую эффекторную функциональную группу, содержащую аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 19 или 87 или последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 99 или 100% идентичностью с ней или имеет не более чем 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 положение, отличающееся от нее, и

b) вторую область, кодирующую второй репрессор экспрессии, при этом второй репрессор экспрессии содержит

i) вторую нацеливающуюся функциональную группу, содержащую аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO:171 или последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 99 или 100% идентичностью с ней или имеет не более чем 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 положение, отличающееся от нее, и

ii) вторую эффекторную функциональную группу, содержащую аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO:18 или последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 99 или 100% идентичностью с ней или имеет не более чем 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 положение, отличающееся от нее.

165. Нуклеиновая кислота согласно варианту осуществления 163 или 164, где первая область расположена на 5'-конце относительно второй области.

166. Нуклеиновая кислота согласно варианту осуществления 163 или 164, где первая область расположена на 3'-конце относительно второй области.

167. Нуклеиновая кислота согласно любому из вариантов осуществления 163-166, где первая область дополнительно содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую первый сигнал ядерной локализации, например NLS SV40, например последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 135 или последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 99 или 100% идентичностью с ней, например, расположенной на N-конце первой нацеливающейся функциональной группы.

168. Нуклеиновая кислота по любому из вариантов осуществления 163-167, где

первая область дополнительно содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую второй сигнал ядерной локализации, например NLS нуклеоплазмина, например последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 136 или последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 99 или 100% идентичностью с ней, например, расположенную на С-конце первой эффекторной функциональной группы.

169. Нуклеиновая кислота согласно любому из вариантов осуществления 163-168, где вторая область дополнительно содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую первый сигнал ядерной локализации, например NLS SV40, например последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 135 или последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 99 или 100% идентичностью с ней, например, расположенную на N-конце второй нацеливающейся функциональной группы.

170. Нуклеиновая кислота согласно любому из вариантов осуществления 163-169, где вторая область дополнительно содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую второй сигнал ядерной локализации, например NLS нуклеоплазмина, например последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 136 или последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 99 или 100% идентичностью с ней, например, расположенную на С-конце второй эффекторной функциональной группы.

171. Нуклеиновая кислота согласно любому из вариантов осуществления 163-170, где первая область дополнительно содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую первый линкер, расположенный между первой нацеливающейся функциональной группой и первой эффекторной функциональной группой, где необязательно первый линкер имеет аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 137 или последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 99 или 100% идентичностью с ней.

172. Нуклеиновая кислота согласно любому из вариантов осуществления 163-171, где вторая область дополнительно содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую второй линкер, расположенный между второй нацеливающейся функциональной группой и второй эффекторной функциональной группой, где необязательно второй линкер имеет аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 138 или последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 99 или 100% идентичностью с ней.

173. Нуклеиновая кислота согласно любому из вариантов осуществления 163-171, где первая область дополнительно содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность, расположенную на С-конце первой эффекторной функциональной группы, например последовательность длиной 30, 25, 20 или 18 аминокислот, например, последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 126 или последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 99 или 100% идентичностью с ней.

174. Нуклеиновая кислота согласно любому из вариантов осуществления 163-173, где вторая область дополнительно содержит нуклеотидную последовательность,

кодирующую аминокислотную последовательность, расположенную на N-конце второй нацеливающейся функциональной группы, например последовательность длиной 30, 25, 20 или 18 аминокислот, например, последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 128 или последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 99 или 100% идентичностью с ней.

175. Нуклеиновая кислота согласно любому из вариантов осуществления 163-174, где первый репрессор экспрессии содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 30 или 129 или последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 99 или 100% идентичностью с ней.

176. Нуклеиновая кислота согласно любому из вариантов осуществления 144-175, где второй репрессор экспрессии содержит аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 177 или 183 или последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 99 или 100% идентичностью с ней.

177. Нуклеиновая кислота согласно любому из вариантов осуществления 144-176, где второй репрессор экспрессии содержит аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 179 или 185 или последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 99 или 100% идентичностью с ней.

178. Нуклеиновая кислота согласно любому из вариантов осуществления 144-177, где первый репрессор экспрессии содержит аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 30 или 129 или последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 99 или 100% идентичностью с ней, и второй репрессор экспрессии содержит аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 24, 141, 177, 179,183 или 185 или последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 99 или 100% идентичностью с ней.

179. Нуклеиновая кислота согласно любому из вариантов осуществления 144-178, где первая область содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую первую нацеливающуюся функциональную группу, где нуклеотидная последовательность, кодирующая первую нацеливающуюся функциональную группу, содержит последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 46 или 131 или последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 99 или 100% идентичностью с ней или имеет не более чем 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 положение, отличающееся от нее.

180. Нуклеиновая кислота согласно любому из вариантов осуществления 144-179, где первая область содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую первую эффекторную функциональную группу, где нуклеотидная последовательность, кодирующая первую эффекторную функциональную группу, содержит последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 52 или 132 или последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 99 или 100% идентичностью с ней или имеет не более чем 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 положение, отличающееся от нее.

181. Нуклеиновая кислота согласно любому из вариантов осуществления 144-180, где вторая область содержит нуклеотидную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 173 или последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 99 или 100% идентичностью с ней или имеет не более чем 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 положение, отличающееся от нее, где поли-А-последовательность является необязательной.

182. Нуклеиновая кислота согласно любому из вариантов осуществления 144-181, где вторая область содержит нуклеотидную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 175 или последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 99 или 100% идентичностью с ней или имеет не более чем 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 положение, отличающееся от нее, где поли-А-последовательность является необязательной.

183. Нуклеиновая кислота согласно любому из вариантов осуществления 144-182, где вторая область содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую вторую эффекторную функциональную группу, где нуклеотидная последовательность, кодирующая вторую эффекторную функциональную группу, содержит последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 51 или последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 99 или 100% идентичностью с ней или имеет не более чем 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 положение, отличающееся от нее.

184. Нуклеиновая кислота согласно любому из вариантов осуществления 144-183, где первая область содержит нуклеотидную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 63 или 130 или последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 99 или 100% идентичностью с ней или имеет не более чем 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 положение, отличающееся от нее, где поли-А-последовательность является необязательной.

185. Нуклеиновая кислота согласно любому из вариантов осуществления 144-184, где вторая область содержит нуклеотидную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 189 или последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 99 или 100% идентичностью с ней или имеет не более чем 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 положение, отличающееся от нее, где поли-А-последовательность является необязательной.

186. Нуклеиновая кислота согласно любому из вариантов осуществления 144-185, где вторая область содержит нуклеотидную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 194 или последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 99 или 100% идентичностью с ней или имеет не более чем 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 положение, отличающееся от нее, где поли-А-последовательность является необязательной.

187. Нуклеиновая кислота согласно любому из вариантов осуществления 144-186, где первая область содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую первую

эффекторную функциональную группу, где нуклеотидная последовательность, кодирующая первую эффекторную функциональную группу, содержит последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 52 или 132 или последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 99 или 100% идентичностью с ней или имеет не более чем 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 положение, отличающееся от нее.

188. Нуклеиновая кислота согласно любому из вариантов осуществления 144-187, где первая область содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую первую нацеливающуюся функциональную группу, где нуклеотидная последовательность, кодирующая первую нацеливающуюся функциональную группу, содержит последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 46 или 131 или последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 99 или 100% идентичностью с ней или имеет не более чем 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 положение, отличающееся от нее.

189. Нуклеиновая кислота согласно любому из вариантов осуществления 144-188, где вторая область содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую вторую эффекторную функциональную группу, где нуклеотидная последовательность, кодирующая вторую эффекторную функциональную группу, содержит последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 51 или последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 99 или 100% идентичностью с ней или имеет не более чем 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 положение, отличающееся от нее.

190. Нуклеиновая кислота согласно любому из вариантов осуществления 144-189, где вторая область содержит нуклеотидную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 189 или последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 99 или 100% идентичностью с ней или имеет не более чем 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 положение, отличающееся от нее.

191. Нуклеиновая кислота согласно любому из вариантов осуществления 144-190, где вторая область содержит нуклеотидную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 194 или последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 99 или 100% идентичностью с ней или имеет не более чем 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 положение, отличающееся от нее.

192. Нуклеиновая кислота согласно любому из вариантов осуществления 144-191, которая содержит нуклеотидную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 93, 112 или последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 99 или 100% идентичностью с ней или имеет не более чем 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 положение, отличающееся от нее.

193. Нуклеиновая кислота согласно любому из вариантов осуществления 144-192, которая содержит нуклеотидную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 196 или 197 или последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95,

99 или 100% идентичностью с ней или имеет не более чем 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 положение, отличающееся от нее.

194. Система или нуклеиновая кислота согласно любому из вариантов осуществления 118-193, где первый репрессор экспрессии содержит первую эффекторную функциональную группу.

195. Система или нуклеиновая кислота согласно любому из вариантов осуществления 118-194, где второй репрессор экспрессии содержит вторую эффекторную функциональную группу.

196. Система или нуклеиновая кислота согласно любому из вариантов осуществления 118-195, где первая эффекторная функциональная группа содержит аминокислотную последовательность, отличную от второй эффекторной функциональной группы.

197. Система или нуклеиновая кислота согласно любому из вариантов осуществления 118-196, где первая эффекторная функциональная группа представляет собой устойчивую эффекторную функциональную группу.

198. Система или нуклеиновая кислота согласно любому из вариантов осуществления 118-125 или 144-197, где первая эффекторная функциональная группа представляет собой неустойчивую эффекторную функциональную группу.

199. Система или нуклеиновая кислота согласно любому из вариантов осуществления 118-198, где первая эффекторная функциональная группа представляет собой эпигенетическую модифицирующую эффекторную группу.

200. Система или нуклеиновая кислота согласно любому из вариантов осуществления 118-143, 163-197 или 199, где первая эффекторная функциональная группа содержит гистонметилтрансферазу.

201. Система или нуклеиновая кислота согласно варианту осуществления 200, где первая эффекторная функциональная группа содержит белок, выбранный из SETDB1, SETDB2, EHMT2 (т. е. G9A), EHMT1 (т. е. GLP), SUV39H1, EZH2, EZH1, SUV39H2, SETD8, SUV420H1, SUV420H2 или функционального варианта или фрагмента любого из них, например домена SET любого из них.

202. Система или нуклеиновая кислота согласно любому из вариантов осуществления 118-143, 163-197 или 199, где первая эффекторная функциональная группа содержит гистондеметилазу (например, лизиндеметилазу).

203. Система или нуклеиновая кислота согласно варианту осуществления 202, где первая эффекторная функциональная группа содержит белок, выбранный из KDM1A (т. е. LSD1), KDM1B (т. е. LSD2), KDM2A, KDM2B, KDM5A, KDM5B, KDM5C, KDM5D, KDM4B, NO66 (или функционального варианта или фрагмента любого из них).

204. Система или нуклеиновая кислота согласно любому из вариантов осуществления 118-143, 163-197 или 199, где первая эффекторная функциональная группа содержит гистондеацетилазу.

205. Система или нуклеиновая кислота согласно варианту осуществления 204, где

первая эффекторная функциональная группа содержит белок, выбранный из HDAC1, HDAC2, HDAC3, HDAC4, HDAC5, HDAC6, HDAC7, HDAC8, HDAC9, HDAC10, HDAC11, SIRT1, SIRT2, SIRT3, SIRT4, SIRT5, SIRT6, SIRT7, SIRT8, SIRT9 или функционального варианта или фрагмента любого из них.

206. Система или нуклеиновая кислота согласно любому из вариантов осуществления 118-197 или 200, где первая эффекторная функциональная группа содержит ДНК-метилтрансферазу.

207. Система или нуклеиновая кислота согласно варианту осуществления 206, где первая эффекторная функциональная группа содержит белок, выбранный из MQ1, DNMT1, DNMT3A1, DNMT3A2, DNMT3B1, DNMT3B2, DNMT3B3, DNMT3B4, DNMT3B5, DNMT3B6, DNMT3L или функционального варианта или фрагмента любого из них.

208. Система или нуклеиновая кислота согласно любому из вариантов осуществления 118-143, 160-196 или 198, где первая эффекторная функциональная группа представляет собой функциональную группу с функцией репрессора транскрипции, например, содержащую репрессор транскрипции.

209. Система или нуклеиновая кислота согласно варианту осуществления 198 или 199, где первая эффекторная функциональная группа содержит белок, выбранный из KRAB, MeCP2, HP1, RBBP4, REST, FOG1, SUZ12 или функционального варианта или фрагмента любого из них.

210. Система или нуклеиновая кислота согласно любому из вариантов осуществления 118-209, где первая эффекторная функциональная группа стимулирует эпигенетическую модификацию регуляторного элемента транскрипции или проксимальной по отношению к нему последовательности.

211. Система или нуклеиновая кислота согласно любому из вариантов осуществления 118-210, где первая эффекторная функциональная группа катализирует эпигенетическую модификацию регуляторного элемента транскрипции или проксимальной по отношению к нему последовательности.

212. Система или нуклеиновая кислота согласно любому из вариантов осуществления 118-125, 194 или 197-211, где второй репрессор экспрессии не содержит эффекторную функциональную группу.

213. Система или нуклеиновая кислота согласно любому из вариантов осуществления 118-212, где вторая эффекторная функциональная группа представляет собой неустойчивую эффекторную функциональную группу.

214. Система или нуклеиновая кислота согласно любому из вариантов осуществления 118-125 или 194-211, где вторая эффекторная функциональная группа представляет собой устойчивую эффекторную функциональную группу.

215. Система или нуклеиновая кислота согласно любому из вариантов осуществления 118-211 или 214, где вторая эффекторная функциональная группа представляет собой эпигенетическую модифицирующую функциональную группу.

216. Система или нуклеиновая кислота согласно любому из вариантов осуществления 118-125, 194-211 или 214-215, где вторая эффекторная функциональная группа содержит гистонметилтрансферазу.

217. Система или нуклеиновая кислота согласно варианту осуществления 216, где вторая эффекторная функциональная группа содержит белок, выбранный из SETDB1, SETDB2, EHMT2 (т. е. G9A), EHMT1 (т. е. GLP), SUV39H1, EZH2, EZH1, SUV39H2, SETD8, SUV420H1, SUV420H2 или функционального варианта или фрагмента любого из них, например домена SET любого из них.

218. Система или нуклеиновая кислота согласно любому из вариантов осуществления 118-125, 194-211 или 214-215, где вторая эффекторная функциональная группа содержит гистондеметилазу (например, лизиндеметилазу).

219. Система или нуклеиновая кислота согласно варианту осуществления 218, где вторая эффекторная функциональная группа содержит белок, выбранный из KDM1A (т. е. LSD1), KDM1B (т. е. LSD2), KDM2A, KDM2B, KDM5A, KDM5B, KDM5C, KDM5D, KDM4B, NO66 (или функционального варианта или фрагмента любого из них).

220. Система или нуклеиновая кислота согласно любому из вариантов осуществления 118-125, 194-211 или 214-215, где вторая эффекторная функциональная группа содержит гистондеацетилазу.

221. Система или нуклеиновая кислота согласно варианту осуществления 220, где вторая эффекторная функциональная группа содержит белок, выбранный из HDAC1, HDAC2, HDAC3, HDAC4, HDAC5, HDAC6, HDAC7, HDAC8, HDAC9, HDAC10, HDAC11, SIRT1, SIRT2, SIRT3, SIRT4, SIRT5, SIRT6, SIRT7, SIRT8, SIRT9 или функционального варианта или фрагмента любого из них.

222. Система или нуклеиновая кислота согласно любому из вариантов осуществления 118-125, 194-211 или 214-215, где вторая эффекторная функциональная группа содержит ДНК-метилтрансферазу.

223. Система или нуклеиновая кислота согласно варианту осуществления 222, где вторая эффекторная функциональная группа содержит белок, выбранный из MQ1, DNMT1, DNMT3A1, DNMT3A2, DNMT3B1, DNMT3B2, DNMT3B3, DNMT3B4, DNMT3B5, DNMT3B6, DNMT3L или функционального варианта или фрагмента любого из них.

224. Система или нуклеиновая кислота согласно любому из вариантов осуществления 118-211 или 213, где вторая эффекторная функциональная группа представляет собой функциональную группу с функцией репрессора транскрипции.

225. Система или нуклеиновая кислота согласно варианту осуществления 224, где вторая эффекторная функциональная группа стимулирует эпигенетическую модификацию якорной последовательности или проксимальной по отношению к ней последовательности.

226. Система или нуклеиновая кислота согласно варианту осуществления 223 или 224, где вторая эффекторная функциональная группа связывается с одним или

несколькими эндогенными эпигенетическими модифицирующими белками или с одним или несколькими эндогенными белками, модифицирующими транскрипцию.

227. Система или нуклеиновая кислота согласно любому из вариантов осуществления 223-226, где вторая эффекторная функциональная группа содержит KRAB, MeCP2, HP1, RBBP4, REST, FOG1, SUZ12 или функциональный вариант или фрагмент любого из них.

228. Система или нуклеиновая кислота согласно любому из вариантов осуществления 118-197, 199-207, 210-211, 213 или 224-227, где

первая эффекторная функциональная группа представляет собой устойчивую эффекторную функциональную группу, и

вторая эффекторная функциональная группа представляет собой неустойчивую эффекторную функциональную группу.

229. Система или нуклеиновая кислота согласно варианту осуществления 228, где первая эффекторная функциональная группа представляет собой эпигенетическую модифицирующую функциональную группу.

230. Система или нуклеиновая кислота согласно варианту осуществления 227 или 228, где вторая эффекторная функциональная группа представляет собой функциональную группу с функцией репрессора транскрипции.

231. Система или нуклеиновая кислота согласно любому из вариантов осуществления 227-230, где

первая эффекторная функциональная группа содержит гистонметилтрансферазу, гистондеметилазу, гистондеацетилазу, ДНК-метилтрансферазу, функциональный вариант или фрагмент любого из них или комбинацию любых из них, и

вторая эффекторная функциональная группа содержит репрессор транскрипции или функциональный вариант или фрагмент любого из них.

232. Система или нуклеиновая кислота согласно любому из вариантов осуществления 118-125, 194, 197, 199-207, 210-212 или 190, где

первая эффекторная функциональная группа содержит гистонметилтрансферазу, гистондеметилазу, гистондеацетилазу, ДНК-метилтрансферазу, функциональный вариант или фрагмент любого из них или комбинацию любых из них, и

второй репрессор экспрессии не содержит вторую эффекторную функциональную группу.

233. Система или нуклеиновая кислота согласно любому из вариантов осуществления 118-125, 199-207, 210-211, 213, 214 или 224-231, где

первая эффекторная функциональная группа содержит SETDB1, SETDB2, EHMT2 (т. е. G9A), EHMT1 (т. е. GLP), SUV39H1, EZH2, EZH1, SUV39H2, SETD8, SUV420H1, SUV420H2, KDM1A (т. е. LSD1), KDM1B (т. е. LSD2), KDM2A, KDM2B, KDM5A, KDM5B, KDM5C, KDM5D, KDM4B, NO66, HDAC1, HDAC2, HDAC3, HDAC4, HDAC5, HDAC6, HDAC7, HDAC8, HDAC9, HDAC10, HDAC11, SIRT1, SIRT2, SIRT3, SIRT4, SIRT5, SIRT6, SIRT7, SIRT8, SIRT9, MQ1, DNMT1, DNMT3A1, DNMT3A2, DNMT3B1,

DNMT3B2, DNMT3B3, DNMT3B4, DNMT3B5, DNMT3B6, DNMT3L, функциональный вариант или фрагмент любого из них или комбинацию любых из них, и

вторая эффекторная функциональная группа содержит KRAB, MeCP2, HP1, RBBP4, REST, FOG1, SUZ12, функциональный вариант или фрагмент любого из них или комбинацию любых из них.

234. Система или нуклеиновая кислота согласно любому из вариантов осуществления 118-197, 199, 206-207, 210-211, 213, 215, 224-231 или 233, где

первая эффекторная функциональная группа содержит ДНК-метилтрансферазу, и

вторая эффекторная функциональная группа содержит репрессор транскрипции.

235. Система или нуклеиновая кислота согласно любому из вариантов осуществления 118-125, 194, 197, 200, 206-207, 210-212 или 232, где

первая эффекторная функциональная группа содержит ДНК-метилтрансферазу, и

второй репрессор экспрессии не содержит вторую эффекторную функциональную группу.

236. Система или нуклеиновая кислота согласно любому из вариантов осуществления 118-125, 200, 206-207, 210-235, где первая эффекторная функциональная группа содержит MQ1, DNMT1, DNMT3A1, DNMT3A2, DNMT3B1, DNMT3B2, DNMT3B3, DNMT3B4, DNMT3B5, DNMT3B6, DNMT3L или функциональный вариант или фрагмент любого из них.

237. Система или нуклеиновая кислота согласно любому из вариантов осуществления 118-211, 214, 224-234 или 236, где вторая эффекторная функциональная группа содержит KRAB, MeCP2, HP1, RBBP4, REST, FOG1, SUZ12 или функциональный вариант или фрагмент любого из них.

238. Система или нуклеиновая кислота согласно любому из вариантов осуществления 118-211, 199, 206-207, 210-211, 213, 224-234 или 236-237, где

первая эффекторная функциональная группа содержит MQ1 или функциональный вариант или фрагмент любого из них, и

второй эффектор содержит KRAB или функциональный вариант или фрагмент любого из них.

239. Система или нуклеиновая кислота согласно любому из вариантов осуществления 118-125, 194, 197, 199-207 или 210-212, 229, 232, 235 или 236, где

первая эффекторная функциональная группа содержит MQ1 или функциональный вариант или фрагмент любого из них, и

второй репрессор экспрессии не содержит вторую эффекторную функциональную группу.

240. Система или нуклеиновая кислота согласно любому из вариантов осуществления 118-200, где первый репрессор экспрессии содержит аминокислотную последовательность, выбранную из любой под SEQ ID NO: 22-37, 129, 133, 134, 139-149, 177-180 или 183-186 или последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95 или 99% идентичностью с ней, или последовательность, которая имеет не

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

241. Система или нуклеиновая кислота согласно любому из вариантов осуществления 118-198, 200, 206-211, 213-216, 222-223, 236-237 или 240, где второй репрессор экспрессии содержит аминокислотную последовательность, выбранную из любой под SEQ ID NO: 22-37, 129, 133, 134, 139-149, 177-180 или 183-186 или последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95 или 99% идентичностью с ней, или последовательность, которая имеет не более чем 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 положение, отличающееся от нее.

242. Система или нуклеиновая кислота согласно любому из вариантов осуществления 118-198, 200, 206-211, 213-216, 222-223, 236-237 или 240-241, где первый репрессор экспрессии содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 30, 129, 133 или последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95 или 99% идентичностью с ней, или последовательность, которая имеет не более чем 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 положение, отличающееся от нее, а второй репрессор экспрессии содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 24, 134, 141, 177, 179, 183 или 185 или последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95 или 99% идентичностью с ней, или последовательность, которая имеет не более чем 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 положение, отличающееся от нее.

243. Система или нуклеиновая кислота согласно любому из вариантов осуществления 118-198, 200, 206-211, 213-216, 222-223, 236-237 или 240-242, где первый репрессор экспрессии кодируется первой нуклеотидной последовательностью под SEQ ID NO: 63 или 130 или последовательностью, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95 или 99% идентичностью с ней, или последовательность, которая имеет не более чем 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 положение, отличающееся от нее, а второй репрессор экспрессии содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 57, 189 или 194 или последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95 или 99% идентичностью с ней, или последовательность, которая имеет не более чем 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 положение, отличающееся от нее.

244. Система или нуклеиновая кислота согласно любому из вариантов осуществления 118-198, 200, 206-211, 213-216, 222-223, 236-237 или 240-243, где первый и второй репрессоры кодируются последовательностью нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 93, 94, 112, 113, 196 или 197 или последовательностью, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95 или 99% идентичностью с ней, или последовательность, которая имеет не более чем 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 положение, отличающееся от нее.

245. Система или нуклеиновая кислота согласно варианту осуществления 244, содержащая аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 91, 92, 121, 122, 181,

182, 187 или 188 или последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95 или 99% идентичностью с ней, или последовательность, которая имеет не более чем 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 положение, отличающееся от нее.

246. Система или нуклеиновая кислота согласно любому из вариантов осуществления 118-197, 199, 206-207, 210-211, 213, 215, 224-231, 233-234, 236-237 или 240-244, где

первый репрессор экспрессии содержит от N-конца к С-концу:

(i) первый сигнал ядерной локализации, например NLS SV40, например последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 135;

(ii) первую нацеливающуюся функциональную группу, например связывающий домен по типу "цинкового пальца", например ZF9; например последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 13;

(iii) первую эффекторную функциональную группу, например ДНК-метилтрансферазу, например MQ1, например последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 19 или 87;

(iv) второй сигнал ядерной локализации, например NLS нуклеоплазмина, например последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 136;

и второй репрессор экспрессии содержит от N-конца к С-концу:

(v) третий сигнал ядерной локализации, например NLS SV40, например последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 135;

(vi) вторую нацеливающуюся функциональную группу, например связывающий домен по типу "цинкового пальца", например ZF3, например последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 7;

(vii) вторую эффекторную функциональную группу, например KRAB, например последовательность в соответствии с SEQ ID NO:18; и

(viii) четвертый сигнал ядерной локализации, например NLS нуклеоплазмина, например последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 136.

247. Система или нуклеиновая кислота согласно любому из вариантов осуществления 118-197, 199, 206-207, 210-211, 213, 215, 224-231, 233-234, 236-237 или 240-244, где

первый репрессор экспрессии содержит от N-конца к С-концу:

(i) первый сигнал ядерной локализации, например NLS SV40, например последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 135;

(ii) первую нацеливающуюся функциональную группу, например связывающий домен по типу "цинкового пальца", например ZF9; например последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 13;

(iii) первую эффекторную функциональную группу, например ДНК-метилтрансферазу, например MQ1, например последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 19 или 87;

(iv) второй сигнал ядерной локализации, например NLS нуклеоплазмина, например последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 136;

и второй репрессор экспрессии содержит от N-конца к С-концу:

(v) третий сигнал ядерной локализации, например NLS SV40, например последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 135;

(vi) вторую нацеливающуюся функциональную группу, например связывающий домен по типу "цинкового пальца", например ZF54, например последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 169;

(vii) вторую эффекторную функциональную группу, например KRAB, например последовательность в соответствии с SEQ ID NO:18; и

(viii) четвертый сигнал ядерной локализации, например NLS нуклеоплазмина, например последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 136.

248. Система или нуклеиновая кислота согласно любому из вариантов осуществления 118-197, 199, 206-207, 210-211, 213, 215, 224-231, 233-234, 236-237 или 240-244, где

первый репрессор экспрессии содержит от N-конца к С-концу:

(i) первый сигнал ядерной локализации, например NLS SV40, например последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 135;

(ii) первую нацеливающуюся функциональную группу, например связывающий домен по типу "цинкового пальца", например ZF9; например последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 13;

(iii) первую эффекторную функциональную группу, например ДНК-метилтрансферазу, например MQ1, например последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 19 или 87;

(iv) второй сигнал ядерной локализации, например NLS нуклеоплазмина, например последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 136;

и второй репрессор экспрессии содержит от N-конца к С-концу:

(v) третий сигнал ядерной локализации, например NLS SV40, например последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 135;

(vi) вторую нацеливающуюся функциональную группу, например связывающий домен по типу "цинкового пальца", например ZF67, например последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 171;

(vii) вторую эффекторную функциональную группу, например KRAB, например последовательность в соответствии с SEQ ID NO:18; и

(viii) четвертый сигнал ядерной локализации, например NLS нуклеоплазмина, например последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 136.

249. Система согласно варианту осуществления 118-248, где система способна снижать уровень экспрессии MYC в большей степени по сравнению с отдельно первым репрессором экспрессии или отдельно вторым репрессором экспрессии.

250. Система согласно любому из вариантов осуществления 128-194 или 242-249,

где система способна снижать уровень экспрессии MYC в большей степени по сравнению с любым из репрессоров экспрессии под SEQ ID: 22, 23, 25-29, 31-37 по отдельности или в комбинации.

251. Система согласно любому из вариантов осуществления 118-250, которая способна уменьшать объем опухоли, например, у субъекта-человека или в модели млекопитающего.

252. Система согласно любому из вариантов осуществления 128-193 или 242-209, где система экспрессии способна уменьшать объем опухоли в такой же или большей степени по сравнению с химиотерапевтическим средством, например, в модели млекопитающего, например, при измерении через 20 дней после начала обработки, например, где репрессор экспрессии вводят каждые 5 дней в дозе 3 мг/кг, например, в модельной системе, описанной в примере 15.

253. Система согласно любому из вариантов осуществления 128-193 или 242-252, где система экспрессии способна уменьшать объем опухоли в большей степени по сравнению с химиотерапевтическим средством, например, в модели млекопитающего, например, при измерении через 15 дней после начала обработки, например, где репрессор экспрессии вводят каждые 5 дней в дозе 6 мг/кг, например, в модельной системе, описанной в примере 14.

254. Система согласно любому из вариантов осуществления 128-193 или 242-253, где объем опухоли уменьшается на по меньшей мере приблизительно 10%, 20%, 30%, 40%, 50% или 60% по сравнению с контролем, обработанным PBS, например, через 20 дней после начала обработки.

255. Система согласно варианту осуществления 254, где химиотерапевтическое средство представляет собой сорафениб или цисплатин.

256. Система согласно любому из вариантов осуществления 128-193 или 242-253, где система способна уменьшать объем опухоли в такой же или большей степени по сравнению с низкомолекулярным ингибитором MYC.

257. Система экспрессии согласно варианту осуществления 256, где низкомолекулярный ингибитор MYC представляет собой MYCi975, где необязательно объем опухоли уменьшается на по меньшей мере приблизительно 10%, 20%, 30% или 40% по сравнению с контролем, обработанным MYCi975, например, через 20 дней после начала обработки.

258. Система согласно любому из вариантов осуществления 118-257, которая не вызывает снижения веса тела по сравнению с началом обработки или вызывает снижение веса тела на менее чем 3%, 2% или 1%.

259. Система или нуклеиновая кислота согласно любому из вариантов осуществления 118-258, где первая нацеливающаяся функциональная группа выбрана из эффекторного домена TAL, домена CRISPR/Cas, домена по типу "цинкового пальца", домена tetR, мегануклеазы или олигонуклеотида.

260. Система или нуклеиновая кислота согласно любому из вариантов

осуществления 118-260, где вторая нацеливающаяся функциональная группа выбрана из эффекторного домена TAL, домена CRISPR/Cas, домена по типу "цинкового пальца", домена tetR, мегануклеазы или олигонуклеотида.

261. Система или нуклеиновая кислота согласно любому из вариантов осуществления 118-260, где первая нацеливающаяся функциональная группа содержит домен CRISPR/Cas (например, первый домен CRISPR/Cas).

262. Система или нуклеиновая кислота согласно любому из вариантов осуществления 118-261, где вторая нацеливающаяся функциональная группа содержит второй домен CRISPR/Cas (например, второй домен CRISPR/Cas).

263. Система или нуклеиновая кислота согласно варианту осуществления 262, где i) первый домен CRISPR/Cas связывает первую направляющую РНК, ii) второй домен CRISPR/Cas связывает вторую направляющую РНК или iii) как (i), так и (ii).

264. Система или нуклеиновая кислота согласно варианту осуществления 262 или 263, где первый домен CRISPR/Cas не связывает вторую направляющую РНК или связывается с $K_D$, составляющей по меньшей мере 10, 20, 50, 100, 1000 или 10000 нМ, и второй домен CRISPR/Cas не связывает первую направляющую РНК или связывается с $K_D$, составляющей по меньшей мере 10, 20, 50, 100, 1000 или 10000 нМ.

265. Система или нуклеиновая кислота согласно любому из вариантов осуществления 260-264, где первый домен CRISPR/Cas содержит аминокислотную последовательность, отличающуюся от второго домена CRISPR/Cas.

266. Система или нуклеиновая кислота согласно любому из вариантов осуществления 260-265, где первый или второй домен CRISPR/Cas содержит аминокислотную последовательность белка Cas или белка Cpf1, выбранную из таблицы 1, или вариант (например, мутантный) любого из них.

267. Система или нуклеиновая кислота согласно любому из вариантов осуществления 260-266, где первый домен CRISPR/Cas содержит аминокислотную последовательность белка Cas или белка Cpf1, выбранного из таблицы 1, или вариант (например, мутантный) любого из них, и второй домен CRISPR/Cas содержит аминокислотную последовательность другого белка Cas или белка Cpf1, выбранного из таблицы 1, или вариант (например, мутантный) любого из них.

268. Система или нуклеиновая кислота согласно любому из вариантов осуществления 118-260, где первая нацеливающаяся функциональная группа содержит домен по типу "цинкового пальца" (например, первый домен по типу "цинкового пальца").

269. Система или нуклеиновая кислота согласно любому из вариантов осуществления 118-260 или 268, где вторая нацеливающаяся функциональная группа содержит домен по типу "цинкового пальца" (например, второй домен по типу "цинкового пальца").

270. Система или нуклеиновая кислота согласно любому из вариантов осуществления 118-261 или 268-269, где первая нацеливающаяся функциональная группа содержит первый домен по типу "цинкового пальца", и вторая нацеливающаяся

функциональная группа содержит второй домен по типу "цинкового пальца".

271. Система или нуклеиновая кислота согласно любому из вариантов осуществления 268-270, где первый домен по типу "цинкового пальца" и второй домен по типу "цинкового пальца" связывают один и тот же геномный локус, например, имеющий одну и ту же аминокислотную последовательность.

272. Система или нуклеиновая кислота согласно любому из вариантов осуществления 268-271, где первый домен по типу "цинкового пальца" и второй домен по типу "цинкового пальца" характеризуются различными аминокислотными последовательностями или связывают различные геномные локусы.

273. Система или нуклеиновая кислота согласно любому из вариантов осуществления 118-261 или 267-272, где первая молекула с "цинковыми пальцами" содержит по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 7, 8, 9 или 10 "цинковых пальцев" (и, необязательно, не более 11, 10, 9, 8, 7, 6 или 5 "цинковых пальцев").

274. Система или нуклеиновая кислота согласно любому из вариантов осуществления 267-273, где первая молекула с "цинковыми пальцами" содержит 1-10, 1-9, 1-8, 1-7, 1-6, 1-5, 1-4, 1-3, 1-2, 2-10, 2-9, 2-8, 2-7, 2-6, 2-5, 2-4, 2-3, 3-10, 3-9, 3-8, 3-7, 3-6, 3-5, 3-4, 4-10, 4-9, 4-8, 4-7, 4-6, 4-5, 5-10, 5-9, 5-8, 5-7, 5-6, 6-10, 6-9, 6-8, 6-7, 7-10, 7-9, 7-8, 8-10, 8-9, или 9-10 "цинковых пальцев".

275. Система или нуклеиновая кислота согласно любому из вариантов осуществления 268-274, где первый домен по типу "цинкового пальца" содержит 3 или 9 "цинковых пальцев".

276. Система или нуклеиновая кислота согласно любому из вариантов осуществления 268-275, где второй домен по типу "цинкового пальца" содержит по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 7, 8, 9 или 10 "цинковых пальцев" (и, необязательно, не более 11, 10, 9, 8, 7, 6 или 5 "цинковых пальцев").

277. Система или нуклеиновая кислота согласно любому из вариантов осуществления 268-276, где второй домен по типу "цинкового пальца" содержит 1-10, 1-9, 1-8, 1-7, 1-6, 1-5, 1-4, 1-3, 1-2, 2-10, 2-9, 2-8, 2-7, 2-6, 2-5, 2-4, 2-3, 3-10, 3-9, 3-8, 3-7, 3-6, 3-5, 3-4, 4-10, 4-9, 4-8, 4-7, 4-6, 4-5, 5-10, 5-9, 5-8, 5-7, 5-6, 6-10, 6-9, 6-8, 6-7, 7-10, 7-9, 7-8, 8-10, 8-9, или 9-10 "цинковых пальцев".

278. Система или нуклеиновая кислота согласно любому из вариантов осуществления 268-277, где второй домен по типу "цинкового пальца" содержит 3 или 9 "цинковых пальцев".

279. Система или нуклеиновая кислота согласно любому из вариантов осуществления 118-278, где первая нацеливающаяся функциональная группа содержит эффекторный домен TAL (например, первый эффекторный домен TAL).

280. Система или нуклеиновая кислота согласно любому из вариантов осуществления 118-260 или 279, где вторая нацеливающаяся функциональная группа содержит эффекторный домен TAL (например, второй эффекторный домен TAL).

281. Система или нуклеиновая кислота согласно любому из вариантов

осуществления 279 или 280, где первый эффекторный домен TAL содержит по меньшей мере 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, или 40 центральных повторов (и, необязательно, не более 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15 или 10 центральных повторов).

282. Система или нуклеиновая кислота согласно любому из вариантов осуществления 279-281, где первый эффекторный домен TAL содержит 2-40, 5-40, 10-40, 15-40, 20-40, 25-40, 30-40, 35-40, 2-35, 5-35, 10-35, 15-35, 20-35, 25-35, 30-35, 2-30, 5-30, 10-30, 15-30, 20-30, 25-30, 2-25, 5-25, 10-25, 15-25, 20-25, 2-20, 5-20, 10-20, 15-20, 2-15, 5-15, 10-15, 2-10, 5-10, или 2-5 центральных повторов.

283. Система или нуклеиновая кислота согласно любому из вариантов осуществления 279 или 282, где второй эффекторный домен TAL содержит по меньшей мере 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, или 40 центральных повторов (и, необязательно, не более 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15 или 10 центральных повторов).

284. Система или нуклеиновая кислота согласно любому из вариантов осуществления 279-283, где второй эффекторный домен TAL содержит 2-40, 5-40, 10-40, 15-40, 20-40, 25-40, 30-40, 35-40, 2-35, 5-35, 10-35, 15-35, 20-35, 25-35, 30-35, 2-30, 5-30, 10-30, 15-30, 20-30, 25-30, 2-25, 5-25, 10-25, 15-25, 20-25, 2-20, 5-20, 10-20, 15-20, 2-15, 5-15, 10-15, 2-10, 5-10, или 2-5 центральных повторов.

285. Система или нуклеиновая кислота согласно любому из вариантов осуществления 118-284, где первая нацеливающаяся функциональная группа содержит нуклеиновую кислоту (например, первую нуклеиновую кислоту).

286. Система согласно любому из вариантов осуществления 129-285, где вторая нацеливающаяся функциональная группа содержит нуклеиновую кислоту (например, вторую нуклеиновую кислоту).

287. Система или нуклеиновая кислота согласно любому из вариантов осуществления 129-286, где первая нацеливающаяся функциональная группа предусматривает полипептид (например, первый полипептид).

288. Система или нуклеиновая кислота согласно любому из вариантов осуществления 129-287, где вторая нацеливающаяся функциональная группа предусматривает полипептид (например, второй полипептид).

289. Система согласно варианту осуществления 287 или 288, где нуклеиновая кислота ковалентно присоединена к полипептиду.

290. Система согласно варианту осуществления 288 или 289, где нуклеиновая кислота нековалентно связана с полипептидом.

291. Система или нуклеиновая кислота согласно любому из вариантов осуществления 275-290, где нуклеиновая кислота содержит последовательность, комплементарную транскрипционному регуляторному элементу, или последовательность, проксимальную по отношению к нему, или содержит не более 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 несовпадения относительно транскрипционного регуляторного элемента или

проксимальной по отношению к нему последовательности.

292. Система или нуклеиновая кислота согласно любому из вариантов осуществления 275-291, где нуклеиновая кислота содержит последовательность, комплементарную якорной последовательности, или последовательность, проксимальную по отношению к ней, или содержит не более 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 несовпадения относительно якорной последовательности или проксимальной по отношению к ней последовательности.

293. Система согласно любому из вариантов осуществления 275-292, где нуклеиновая кислота предусматривает ДНК, пептидную нуклеиновую кислоту (PNA), конъюгат пептид-олигонуклеотид, запертую нуклеиновую кислоту (LNA), мостиковую нуклеиновую кислоту (BNA), полиамид, образующий триплекс олигонуклеотид, антисмысловой олигонуклеотид, tRNA, mRNA, rRNA, miRNA, gRNA, siRNA или другие молекулы RNAi.

294. Система согласно любому из вариантов осуществления 275-293, где нуклеиновая кислота предусматривает gRNA.

295. Система согласно любому из вариантов осуществления 275-294, где нуклеиновая кислота содержит последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 99 или 100% идентичностью с любой из SEQ ID NO: 1-4 или имеет не более 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 положений, отличающихся от нее.

296. Система согласно любому из вариантов осуществления 275-295, где первая нуклеиновая кислота содержит последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 99 или 100% идентичностью с любой из SEQ ID NO: 1-4 или имеет не более 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 положений, отличающихся от нее, и вторая нуклеиновая кислота содержит последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 99 или 100% идентичностью с любой из SEQ ID NO: 1-4 или имеет не более 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 положений, отличающихся от нее.

297. Система согласно любому из вариантов осуществления 275-295, где первая нуклеиновая кислота содержит последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 99 или 100% идентичностью с любой из SEQ ID NO: 96-110 или имеет не более 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 положений, отличающихся от нее, и вторая нуклеиновая кислота содержит последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 99 или 100% идентичностью с любой из SEQ ID NO: 96-110 или имеет не более 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 положений, отличающихся от нее.

298. Система согласно любому из вариантов осуществления 118-297, где транскрипционный регуляторный элемент предусматривает промотор.

299. Система согласно любому из вариантов осуществления 118-298, где транскрипционный регуляторный элемент предусматривает энхансер; например суперэнхансер.

300. Система согласно любому из вариантов осуществления 118-299, где якорная последовательность содержит CTCF-связывающий мотив.

301. Система согласно любому из вариантов осуществления 118-300, где якорная последовательность содержит а YY1-связывающий мотив.

302. Система согласно любому из вариантов осуществления 118-301, где якорная последовательность содержит последовательность под SEQ ID NO: 71 или 72 или последовательность, которая характеризуется не более чем 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 изменением относительно нее.

303. Система согласно любому из вариантов осуществления 118-302, где якорная последовательность содержит последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 73 или 74 или последовательность, которая характеризуется не более чем 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 изменением относительно нее.

304. Система согласно любому из вариантов осуществления 118-303, где якорная последовательность расположена в той же хромосоме, что и ген MYC.

305. Система согласно любому из вариантов осуществления 118-304, где якорная последовательность расположена выше гена MYC (например, выше TSS или выше промотора).

306. Система согласно любому из вариантов осуществления 118-305, где якорная последовательность удалена на по меньшей мере 1, 5, 10, 50, 100 или 1000 тысяч пар оснований от гена MYC (например, от TSS или промотора гена MYC).

307. Система согласно любому из вариантов осуществления 118-306, где якорная последовательность удалена на 0,1-0,5, 0,1-1, 0,1-5, 0,1-10, 0,1-50, 0,1-100, 0,1-500, 0,1-1000, 0,5-1, 0,5-5, 0,5-10, 0,5-50, 0,5-100, 0,5-500, 0,5-1000, 1-5, 1-10, 1-50, 1-100, 1-500, 1-1000, 5-10, 5-50, 5-100, 5-500, 5-1000, 10-50, 10-100, 10-500, 10-1000, 50-100, 50-500, 50-1000, 100-500, 100-1000, или 500-1000 тысяч пар оснований от гена MYC (например, от TSS или промотора гена MYC).

308. Система согласно любому из вариантов осуществления 118-303 или 305-307, где якорная последовательность расположена в иной хромосоме, нежели ген MYC.

309. Система согласно любому из вариантов осуществления 118-308, где вторая нацеливающаяся функциональная группа связывается с якорной последовательностью или последовательностью, проксимальной по отношению к якорной последовательности, с аффинностью, достаточной для конкуренции за связывание с эндогенным полипептидом (например, CTCF или YY1).

310. Система согласно любому из вариантов осуществления 118-309, где первая нацеливающаяся функциональная группа связывается с последовательностью в хромосомных координатах 128746342-128746364, 128746321-128746343 или 128746525-128746547 или проксимальной по отношению к ней последовательностью.

311. Система согласно любому из вариантов осуществления 118-309, где первая нацеливающаяся функциональная группа связывается с последовательностью в хромосомных координатах 128746405-128746425, 128748069-128748089, 129188825-129188845 или 129188822-129188842 или проксимальной по отношению к ней последовательностью.

312. Система согласно любому из вариантов осуществления 118-311, где вторая нацеливающаяся функциональная группа связывается с последовательностью в хромосомных координатах 128748014-128748036 или проксимальной по отношению к ней последовательностью.

313. Система согласно любому из вариантов осуществления 118-311, где вторая нацеливающаяся функциональная группа связывается с последовательностью в хромосомных координатах 128746405-128746425, 128748069-128748089, 129188825-129188845 или 129188822-129188842 или проксимальной по отношению к ней последовательностью.

314. Система согласно любому из вариантов осуществления 118-314, где первый репрессор экспрессии представляет собой слитую молекулу.

315. Система согласно любому из вариантов осуществления 118-314, где второй репрессор экспрессии представляет собой слитую молекулу.

316. Система согласно любому из вариантов осуществления 118-315, где первый репрессор экспрессии содержит линкер.

317. Система согласно любому из вариантов осуществления 118-316, где второй репрессор экспрессии содержит линкер.

318. Система согласно любому из вариантов осуществления 118-267 или 285-317, где

первый репрессор экспрессии содержит нацеливающуюся функциональную группу, предусматривающую первую молекулу CRISPR/Cas, например предусматривающую первый каталитический неактивный белок CRISPR/Cas, и эффекторную функциональную группу, предусматривающую эпигенетическую модифицированную функциональную группу; и

второй репрессор экспрессии содержит нацеливающуюся функциональную группу, предусматривающую вторую молекулу CRISPR/Cas, например предусматривающую второй каталитический неактивный белок CRISPR/Cas, и необязательно эффекторную функциональную группу, предусматривающую репрессор транскрипции.

319. Система согласно любому из вариантов осуществления 118-260, 268-278 или 285-317, где

первый репрессор экспрессии содержит нацеливающуюся функциональную группу, предусматривающую первый домен по типу "цинкового пальца", и эффекторную функциональную группу, предусматривающую эпигенетическую модифицирующую функциональную группу; и

второй репрессор экспрессии содержит нацеливающуюся функциональную группу, предусматривающую второй домен по типу "цинкового пальца", и необязательно эффекторную функциональную группу, предусматривающую репрессор транскрипции.

320. Система согласно любому из вариантов осуществления 118-120, 262, 268 или 275-318, где

первый репрессор экспрессии содержит нацеливающуюся функциональную

группу, предусматривающую молекулу CRISPR/Cas, например предусматривающую каталитический неактивный белок CRISPR/Cas, и эффекторную функциональную группу, предусматривающую эпигенетическую модифицированную функциональную группу; и

второй репрессор экспрессии содержит нацеливающуюся функциональную группу, предусматривающую домен по типу "цинкового пальца", и необязательно эффекторную функциональную группу, предусматривающую репрессор транскрипции.

321. Система согласно любому из вариантов осуществления 118-260, 268 или 275-318, где

первый репрессор экспрессии содержит нацеливающуюся функциональную группу, предусматривающую домен по типу "цинкового пальца", и эффекторную функциональную группу, предусматривающую эпигенетическую модифицирующую функциональную группу; и

второй репрессор экспрессии содержит нацеливающуюся функциональную группу, предусматривающую домен CRISPR/Cas, например предусматривающую каталитический неактивный белок CRISPR/Cas, и необязательно эффекторную функциональную группу, предусматривающую репрессор транскрипции.

322. Система согласно любому из вариантов осуществления 260, 268-278 или 275-318, где домен по типу "цинкового пальца" (например, первый или второй домен по типу "цинкового пальца") содержит 1-10, 1-9, 1-8, 1-7, 1-6, 1-5, 1-4, 1-3, 1-2, 2-10, 2-9, 2-8, 2-7, 2-6, 2-5, 2-4, 2-3, 3-10, 3-9, 3-8, 3-7, 3-6, 3-5, 3-4, 4-10, 4-9, 4-8, 4-7, 4-6, 4-5, 5-10, 5-9, 5-8, 5-7, 5-6, 6-10, 6-9, 6-8, 6-7, 7-10, 7-9, 7-8, 8-10, 8-9, или 9-10 "цинковых пальцев", например 3 или 9 "цинковых пальцев".

323. Система согласно любому из вариантов осуществления 322, где эпигенетическая модифицирующая функциональная группа предусматривает ДНК-метилтрансферазу.

324. Система согласно любому из вариантов осуществления 118-323, где эпигенетическая модифицирующая функциональная группа предусматривает MQ1 или его функциональный вариант или фрагмент.

325. Система согласно любому из вариантов осуществления 118-324, где второй репрессор экспрессии содержит эффекторную функциональную группу, предусматривающую репрессор транскрипции.

326. Система согласно любому из вариантов осуществления 118-323, где репрессор транскрипции содержит KRAB или его функциональный вариант или фрагмент.

327. Система согласно любому из вариантов осуществления 118-326, где первый репрессор экспрессии содержит аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 28-33 или 35-37, 145-149, 151, 152 или последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 99 или 100% идентичностью с ней или имеет не более чем 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 положение, отличающееся от нее.

328. Система согласно любому из вариантов осуществления 118-327, где второй

репрессор экспрессии содержит аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 22-27, 34, 139-144, 150, 177-180, 183-186 или последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 99 или 100% идентичностью с ней или имеет не более чем 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 положение, отличающееся от нее.

329. Система согласно любому из вариантов осуществления 118-328, где связывание первого репрессора экспрессии с регуляторным элементом транскрипции или проксимальной по отношению к нему последовательностью снижает уровень экспрессии MYC в клетке.

330. Система согласно варианту осуществления 327, где уровень экспрессии снижается на 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100% по сравнению с уровнем экспрессии в отсутствие первого репрессора экспрессии, например, при измерении посредством QPCR или ELISA.

331. Система согласно варианту осуществления 326 или 327, где связывание первого репрессора экспрессии с регуляторным элементом транскрипции в значительной степени снижает уровень экспрессии MYC на период времени, составляющий по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25 дней или по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 клеточных делений, например, при измерении посредством ELISA.

332. Система согласно любому из вариантов осуществления 329-331, где связывание первого репрессора экспрессии с регуляторным элементом транскрипции в значительной степени снижает уровень экспрессии MYC через 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36, 40, 44, 48, 52, 56, 60, 64, 68, 72, 76, 80 или 96 часов после трансфекции.

333. Система согласно любому из вариантов осуществления 328-332, где связывание второго репрессора экспрессии с якорной последовательностью или проксимальной по отношению к ней последовательностью снижает уровень экспрессии MYC в клетке.

334. Система согласно варианту осуществления 333, где уровень экспрессии снижается на 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100% по сравнению с уровнем экспрессии в отсутствие второго репрессора экспрессии, например, при измерении посредством QPCR или ELISA.

335. Система согласно варианту осуществления 333 или 334, где связывание второго репрессора экспрессии с якорной последовательностью или проксимальной по отношению к ней последовательностью в значительной степени снижает уровень экспрессии MYC на период времени, составляющий по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25 дней или по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 клеточных делений, например, при измерении посредством ELISA.

336. Система согласно любому из вариантов осуществления 334-335, где

связывание второго репрессора экспрессии с якорной последовательностью или проксимальной по отношению к ней последовательностью в значительной степени снижает уровень экспрессии MYC через 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36, 40, 44, 48, 52, 56, 60, 64, 68, 72, 76, 80 или 96 часов после трансфекции.

337. Система согласно любому из вариантов осуществления 329-336, где связывание первого репрессора экспрессии с регуляторным элементом транскрипции или проксимальной по отношению к нему последовательностью и второго репрессора экспрессии с якорной последовательностью или проксимальной по отношению к ней последовательностью снижает уровень экспрессии MYC в клетке.

338. Система согласно любому из вариантов осуществления 329-337, где связывание первого репрессора экспрессии с регуляторным элементом транскрипции или проксимальной по отношению к нему последовательностью и связывание второго репрессора экспрессии с якорной последовательностью или проксимальной по отношению к ней последовательностью в значительной степени снижает уровень экспрессии MYC через 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36, 40, 44, 48, 52, 56, 60, 64, 68, 72, 76, 80 или 96 часов после трансфекции.

339. Система согласно любому из вариантов осуществления 337 или 338, где уровень экспрессии снижается на 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100% по сравнению с уровнем экспрессии в отсутствие первого и второго репрессоров экспрессии, например, при измерении посредством QPCR или ELISA.

340. Система согласно любому из вариантов осуществления 329-339, где связывание первого репрессора экспрессии с регуляторным элементом транскрипции или проксимальной по отношению к нему последовательностью и второго репрессора экспрессии с якорной последовательностью или проксимальной по отношению к ней последовательностью в значительной степени снижает уровень экспрессии MYC на период времени, составляющий по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 часов, или по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25 дней, или по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 клеточных делений, например, при измерении посредством ELISA.

341. Система согласно любому из вариантов осуществления 329-340, где снижение уровня экспрессии в результате связывания первого репрессора экспрессии с регуляторным элементом транскрипции или проксимальной по отношению к нему последовательностью и второго репрессора экспрессии с якорной последовательностью или проксимальной по отношению к ней последовательностью больше снижения уровня экспрессии в результате связывания первого репрессора экспрессии с регуляторным элементом транскрипции или проксимальной по отношению к нему последовательностью или связывания второго репрессора экспрессии с якорной последовательностью или проксимальной по отношению к ней последовательностью по отдельности.

342. Система согласно варианту осуществления 341, где связывание первого репрессора экспрессии с регуляторным элементом транскрипции или проксимальной по

отношению к нему последовательностью и второго репрессора экспрессии с якорной последовательностью или проксимальной по отношению к ней последовательностью снижает уровень экспрессии в 1,05x (т. е. 1,05 раза), 1,1x, 1,15x, 1,2x, 1,25x, 1,3x, 1,35x, 1,4x, 1,45x, 1,5x, 1,6x, 1,7x, 1,8x, 1,9x, 2x, 3x, 4x, 5x, 6x, 7x, 8x, 9x, 10x, 20x, 50x, или 100x больше, чем либо связывание первого репрессора экспрессии с регуляторным элементом транскрипции или проксимальной по отношению к нему последовательностью, либо связывание второго репрессора экспрессии с якорной последовательностью или проксимальной по отношению к ней последовательностью по отдельности, например, при измерении посредством QPCR или ELISA.

343. Система согласно любому из вариантов осуществления 329-342, где снижение уровня экспрессии в результате связывания первого репрессора экспрессии с регуляторным элементом транскрипции или проксимальной по отношению к нему последовательностью и второго репрессора экспрессии с якорной последовательностью или проксимальной по отношению к ней последовательностью сохраняется в течение более длительного времени (например, больше часов, дней или клеточных делений), чем снижение уровня экспрессии в результате связывания первого репрессора экспрессии с регуляторным элементом транскрипции или проксимальной по отношению к нему последовательностью или связывания второго репрессора экспрессии с якорной последовательностью или проксимальной по отношению к ней последовательностью по отдельности.

344. Система согласно варианту осуществления 343, где связывание первого репрессора экспрессии с регуляторным элементом транскрипции или проксимальной по отношению к нему последовательностью и второго репрессора экспрессии с якорной последовательностью или проксимальной по отношению к ней последовательностью снижает уровень экспрессии в 1,05x (т. е. 1,05 раза), 1,1x, 1,15x, 1,2x, 1,25x, 1,3x, 1,35x, 1,4x, 1,45x, 1,5x, 1,6x, 1,7x, 1,8x, 1,9x, 2x, 3x, 4x, 5x, 6x, 7x, 8x, 9x, 10x, 20x, 50x, или 100x дольше (например, больше часов, дней или клеточных делений), чем либо связывание первого репрессора экспрессии с регуляторным элементом транскрипции или проксимальной по отношению к нему последовательностью, либо связывание второго репрессора экспрессии с якорной последовательностью или проксимальной по отношению к ней последовательностью по отдельности, например, при измерении посредством QPCR или ELISA.

345. Система согласно любому из вариантов осуществления 329-344, где связывание первого репрессора экспрессии с промотором или проксимальной по отношению к нему последовательностью и второго репрессора экспрессии с суперэнхансером или проксимальной по отношению к нему последовательностью в значительной степени снижает уровень экспрессии MYC на период времени, составляющий по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 часов, или по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25 дней, или по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 клеточных делений, например, при

измерении посредством ELISA.

346. Система согласно любому из вариантов осуществления 329-345, где снижение уровня экспрессии в результате связывания первого репрессора экспрессии с промотором или проксимальной по отношению к нему последовательностью и второго репрессора экспрессии с суперэнхансером или проксимальной по отношению к нему последовательностью больше снижения уровня экспрессии в результате связывания первого репрессора экспрессии с промотором или проксимальной по отношению к нему последовательностью или связывания второго репрессора экспрессии с суперэнхансером или проксимальной по отношению к нему последовательностью по отдельности.

347. Система согласно варианту осуществления 346, где связывание первого репрессора экспрессии с промотором или проксимальной по отношению к нему последовательностью и второго репрессора экспрессии с суперэнхансером или проксимальной по отношению к нему последовательностью снижает уровень экспрессии в 1,05x (т. е. 1,05 раза), 1,1x, 1,15x, 1,2x, 1,25x, 1,3x, 1,35x, 1,4x, 1,45x, 1,5x, 1,6x, 1,7x, 1,8x, 1,9x, 2x, 3x, 4x, 5x, 6x, 7x, 8x, 9x, 10x, 20x, 50x, или 100x больше, чем либо связывание первого репрессора экспрессии с промотором или проксимальной по отношению к нему последовательностью, либо связывания второго репрессора экспрессии с суперэнхансером или проксимальной по отношению к нему последовательностью по отдельности, например, при измерении посредством QPCR или ELISA.

348. Система согласно любому из вариантов осуществления 329-347, где снижение уровня экспрессии в результате связывания первого репрессора экспрессии с промотором или проксимальной по отношению к нему последовательностью и второго репрессора экспрессии с суперэнхансером или проксимальной по отношению к нему последовательностью сохраняется в течение более длительного времени (например, больше часов, суток или клеточных делений), чем снижение уровня экспрессии в результате связывания первого репрессора экспрессии с промотором или проксимальной по отношению к нему последовательностью или связывания второго репрессора экспрессии с суперэнхансером или проксимальной по отношению к нему последовательностью по отдельности.

349. Система согласно варианту осуществления 348, где связывание первого репрессора экспрессии с промотором или проксимальной по отношению к нему последовательностью и второго репрессора экспрессии с суперэнхансером или проксимальной по отношению к нему последовательностью снижает уровень экспрессии в 1,05x (т. е. 1,05 раза), 1,1x, 1,15x, 1,2x, 1,25x, 1,3x, 1,35x, 1,4x, 1,45x, 1,5x, 1,6x, 1,7x, 1,8x, 1,9x, 2x, 3x, 4x, 5x, 6x, 7x, 8x, 9x, 10x, 20x, 50x, или 100x дольше (например, больше часов, дней или клеточных делений), чем либо связывание первого репрессора экспрессии с промотором или проксимальной по отношению к нему последовательностью, либо связывания второго репрессора экспрессии с суперэнхансером или проксимальной по отношению к нему последовательностью по отдельности, например, при измерении посредством QPCR или ELISA.

350. Система согласно любому из вариантов осуществления 329-349, где уровень экспрессии в значительной степени снижается на неопределенный период времени (например, на период времени, больший, чем может быть экспериментально измерено).

351. Система согласно любому из вариантов осуществления 329-350, где связывание первого репрессора экспрессии с регуляторным элементом транскрипции или проксимальной по отношению к нему последовательностью снижает жизнеспособность клетки, содержащей регуляторный элемент транскрипции или проксимальную по отношению к нему последовательность.

352. Система согласно любому из вариантов осуществления 329-351, где приведение множества клеток в контакт с первым репрессором экспрессии или нуклеиновой кислотой, кодирующей первый репрессор экспрессии, снижает жизнеспособность множества клеток, где необязательно множество клеток предусматривает раковые и нераковые клетки и/или инфицированные клетки и неинфицированные клетки.

353. Система согласно варианту осуществления 352, где жизнеспособность снижается на 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100% по сравнению с жизнеспособностью в отсутствие первого репрессора экспрессии, например, при измерении посредством CellTiter Glo.

354. Система согласно любому из вариантов осуществления 329-353, где введение первого репрессора экспрессии приводит к апоптозу по меньшей мере 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 12%, 15%, 17%, 20%, 25% 30%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 75% клеток-мишеней (например, раковых клеток).

355. Система согласно любому из вариантов осуществления 329-354, где связывание второго репрессора экспрессии с якорной последовательностью или проксимальной по отношению к ней последовательностью снижает жизнеспособность клетки, содержащей якорную последовательность или проксимальную по отношению к ней последовательность.

356. Система согласно любому из вариантов осуществления 329-355, где приведение множества клеток в контакт со вторым репрессором экспрессии или нуклеиновой кислотой, кодирующей второй репрессор экспрессии, снижает жизнеспособность множества клеток.

357. Система согласно любому из вариантов осуществления 329-356, где связывание второго репрессора экспрессии с суперэнхансером или проксимальной по отношению к нему последовательностью снижает жизнеспособность клетки, содержащей регуляторный элемент транскрипции или проксимальную по отношению к нему последовательность.

358. Система согласно любому из вариантов осуществления 329-357, где приведение множества клеток в контакт со вторым репрессором экспрессии или нуклеиновой кислотой, кодирующей первый репрессор экспрессии, снижает жизнеспособность множества клеток, где необязательно множество клеток

предусматривает раковые и нераковые клетки и/или инфицированные клетки и неинфицированные клетки.

359. Система согласно варианту осуществления 358, где жизнеспособность снижается на 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100% по сравнению с жизнеспособностью в отсутствие второго репрессора экспрессии, например, при измерении посредством CellTiter Glo.

360. Система согласно любому из вариантов осуществления 329-359, где введение второго репрессора экспрессии приводит к апоптозу по меньшей мере 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 12%, 15%, 17%, 20%, 25% 30%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 75% клеток-мишеней (например, раковых клеток).

361. Система согласно любому из вариантов осуществления 329-360, где связывание первого репрессора экспрессии с регуляторным элементом транскрипции или проксимальной по отношению к нему последовательностью и второго репрессора экспрессии с якорной последовательностью или проксимальной по отношению к ней последовательностью снижает жизнеспособность клетки, содержащей якорную последовательность или проксимальную по отношению к ней последовательность.

362. Система согласно любому из вариантов осуществления 329-361, где связывание первого репрессора экспрессии с промотором или проксимальной по отношению к нему последовательностью и второго репрессора экспрессии с суперэнхансером или проксимальной по отношению к нему последовательностью снижает жизнеспособность клетки.

363. Система согласно любому из вариантов осуществления 329-362, где приведение множества клеток в контакт с системой или нуклеиновой кислотой, кодирующей систему, снижает жизнеспособность множества клеток.

364. Система согласно вариантам осуществления 329-363, где жизнеспособность снижается на 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100% по сравнению с жизнеспособностью в отсутствие системы, например, при измерении посредством CellTiter Glo.

365. Система согласно любому из вариантов осуществления 329-364, где снижение жизнеспособности в результате связывания первого репрессора экспрессии с регуляторным элементом транскрипции или проксимальной по отношению к нему последовательностью и второго репрессора экспрессии с якорной последовательностью или проксимальной по отношению к ней последовательностью больше снижения жизнеспособности в результате связывания первого репрессора экспрессии с регуляторным элементом транскрипции или проксимальной по отношению к нему последовательностью или связывания второго репрессора экспрессии с якорной последовательностью или проксимальной по отношению к ней последовательностью по отдельности.

366. Система согласно любому из вариантов осуществления 329-365, где снижение жизнеспособности в результате связывания первого репрессора экспрессии с промотором

или проксимальной по отношению к нему последовательностью и второго репрессора экспрессии с суперэнхансером или проксимальной по отношению к нему последовательностью больше снижения жизнеспособности в результате связывания первого репрессора экспрессии с промотором или проксимальной по отношению к нему последовательностью или связывания второго репрессора экспрессии с суперэнхансером или проксимальной по отношению к нему последовательностью по отдельности.

367. Система согласно варианту осуществления 366, где связывание первого репрессора экспрессии с регуляторным элементом транскрипции или проксимальной по отношению к нему последовательностью и второго репрессора экспрессии с якорной последовательностью или проксимальной по отношению к ней последовательностью снижает жизнеспособность в 1,05x (т. е. 1,05 раза), 1,1x, 1,15x, 1,2x, 1,25x, 1,3x, 1,35x, 1,4x, 1,45x, 1,5x, 1,6x, 1,7x, 1,8x, 1,9x, 2x, 3x, 4x, 5x, 6x, 7x, 8x, 9x, 10x, 20x, 50x, или 100x больше, чем либо связывание первого репрессора экспрессии с регуляторным элементом транскрипции или проксимальной по отношению к нему последовательностью, либо связывание второго репрессора экспрессии с якорной последовательностью или проксимальной по отношению к ней последовательностью по отдельности, например, при измерении посредством CellTiter Glo.

368. Система согласно варианту осуществления 366 или 367, где связывание первого репрессора экспрессии с промотором или проксимальной по отношению к нему последовательностью и второго репрессора экспрессии с суперэнхансером или проксимальной по отношению к нему последовательностью снижает жизнеспособность в 1,05x (т. е. 1,05 раза), 1,1x, 1,15x, 1,2x, 1,25x, 1,3x, 1,35x, 1,4x, 1,45x, 1,5x, 1,6x, 1,7x, 1,8x, 1,9x, 2x, 3x, 4x, 5x, 6x, 7x, 8x, 9x, 10x, 20x, 50x, или 100x больше, чем либо связывание первого репрессора экспрессии с промотором или проксимальной по отношению к нему последовательностью, либо связывания второго репрессора экспрессии с суперэнхансером или проксимальной по отношению к нему последовательностью по отдельности, например, при измерении посредством CellTiter Glo.

369. Система согласно любому из вариантов осуществления 329-368, где введение первого репрессора экспрессии и второго репрессора экспрессии приводит к апоптозу по меньшей мере 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 12%, 15%, 17%, 20%, 25% 30%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 75% клеток-мишеней (например, раковых клеток).

370. Система согласно вариантам осуществления 329-369, где множество клеток предусматривает множество раковых клеток и множество нераковых клеток.

371. Система согласно варианту осуществления 370, где приведение множества клеток в контакт с системой или нуклеиновой кислотой, кодирующей систему, снижает жизнеспособность множества раковых клеток в большей степени, чем жизнеспособность множества нераковых клеток.

372. Система согласно варианту осуществления 370 или 371, где приведение множества клеток в контакт с системой или нуклеиновой кислотой, кодирующей систему, снижает жизнеспособность множества раковых клеток в 1,05x (т. е. 1,05 раза), 1,1x, 1,15x,

1,2x, 1,25x, 1,3x, 1,35x, 1,4x, 1,45x, 1,5x, 1,6x, 1,7x, 1,8x, 1,9x, 2x, 3x, 4x, 5x, 6x, 7x, 8x, 9x, 10x, 20x, 50x, или 100x больше, чем жизнеспособность множества нераковых клеток.

373. Репрессор экспрессии или система согласно любому из предыдущих вариантов осуществления, которые не снижают жизнеспособность нераковых клеток (например, первичных гепатоцитов) более чем на 5, 10, 15 или 20%, например, при анализе в соответствии с примером 29.

374. Репрессор экспрессии или система согласно варианту осуществления 320, где жизнеспособность оценивают через 72 часа после приведения клеток в контакт с репрессором экспрессии или системой.

375. Репрессор экспрессии или система согласно варианту осуществления 374, где анализ предусматривает приведение нераковых клеток в контакт с 2,5, 2, 1,25, 1, 0,6 или 0,5 мкг/мл репрессора экспрессии или системы.

376. Система согласно любому из вариантов осуществления 352-375, которая при контакте с множеством инфицированных клеток и множеством неинфицированных клеток снижает жизнеспособность множества инфицированных клеток в большей степени, чем снижает жизнеспособность множества неинфицированных клеток, и/или снижает жизнеспособность множества раковых клеток в большей степени, чем снижает жизнеспособность множества нераковых клеток.

377. Система согласно любому из вариантов осуществления 352-376, где рак представляет собой гепатоклеточную карциному (HCC), фиброламеллярную гепатоклеточную карциному (FHCC), холангиокарциному, ангиосаркому, вторичный рак печени, немелкоклеточный рак легкого (NSCLC), аденокарциному, мелкоклеточный рак легкого (SCLC), крупноклеточную (недифференцированную) карциному, трижды негативный рак молочной железы, аденокарциному желудка, карциному эндометрия или карциному поджелудочной железы.

378. Система согласно любому из вариантов осуществления 352-377, где раковые клетки представляют собой раковые клетки легкого, раковые клетки желудка, раковые клетки желудочно-кишечного тракта, колоректальные раковые клетки, раковые клетки поджелудочной железы или раковые клетки печени.

379. Система согласно любому из вариантов осуществления 352-378, где клетки представляют собой эпителиальные клетки легких человека или фибробластные клетки легких человека.

380. Система согласно любому из вариантов осуществления 352-379, где инфекция имеет вирусную природу.

381. Репрессор экспрессии согласно варианту осуществления 380, где вирусная инфекция представляет собой гепатит, например гепатит B.

382. Система согласно любому из вариантов осуществления 378-381, где инфицированные клетки представляют собой гепатоциты человека.

383. Система согласно любому из вариантов осуществления 352-382, где вирусная инфекция является хронической инфекцией.

384. Слитый белок, содержащий

первую аминокислотную область, содержащую последовательность, кодирующую первый репрессор экспрессии системы согласно любому из вариантов осуществления 118-383; и

вторую аминокислотную область, содержащую последовательность, кодирующую второй репрессор экспрессии системы согласно любому из вариантов осуществления 118-383.

385. Слитый белок согласно варианту осуществления 384, который содержит третью аминокислотную область, где третья аминокислотная область расположена между первой аминокислотной областью и второй аминокислотной областью.

386. Слитый белок согласно варианту осуществления 385, где третья аминокислотная область содержит расщепляемую протеазой пептидную последовательность, например саморасщепляющуюся пептидную последовательность, например саморасщепляющуюся пептидную последовательность T2A, например последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 120.

387. Слитый белок согласно варианту осуществления 386, где третья аминокислотная область содержит расщепляемую протеазой пептидную последовательность, например саморасщепляющуюся пептидную последовательность, например пептидную последовательность тандема 2A, например последовательность tPT2A, например последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 124.

388. Слитый белок согласно варианту осуществления 385, где пептидная последовательность предусматривает пептидную последовательность T2A и пептидную последовательность P2A.

389. Слитый белок согласно любому из вариантов осуществления 384-388, где

первый репрессор экспрессии содержит аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 30 или 129 или последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95 или 99% идентичностью с ней; и

второй репрессор экспрессии содержит аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 24 или 142 или последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95 или 99% идентичностью с ней.

390. Слитый белок согласно любому из вариантов осуществления 384-388, где

первый репрессор экспрессии содержит аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 30 или 129 или последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95 или 99% идентичностью с ней; и

второй репрессор экспрессии содержит аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 177 или 183 или последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95 или 99% идентичностью с ней.

391. Слитый белок согласно любому из вариантов осуществления 384-388, где

первый репрессор экспрессии содержит аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 30 или 129 или последовательность, которая характеризуется

по меньшей мере 80, 85, 90, 95 или 99% идентичностью с ней; и

второй репрессор экспрессии содержит аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 179 или 185 или последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95 или 99% идентичностью с ней.

392. Слитый белок согласно любому из вариантов осуществления 384-391, который содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 91, 92, 121 или 122 или последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95 или 99% идентичностью с ней, или последовательность, которая имеет не более чем 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 положение, отличающееся от нее.

393. Слитый белок согласно любому из вариантов осуществления 384-392, который содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 181, 182, 187 или 188 или последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95 или 99% идентичностью с ней, или последовательность, которая имеет не более чем 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 положение, отличающееся от нее.

394. Нуклеиновая кислота, содержащая последовательность, кодирующую систему согласно любому из вариантов осуществления 118-393.

395. Нуклеиновая кислота, содержащая последовательность, кодирующую систему согласно варианту осуществления 394.

396. Нуклеиновая кислота согласно варианту осуществления 394 или 395, которая содержит

первую область, содержащую последовательность, кодирующую первый репрессор экспрессии системы согласно любому из вариантов осуществления 118-393; и

вторую область, содержащую последовательность, кодирующую второй репрессор экспрессии системы согласно любому из вариантов осуществления 118-393.

397. Нуклеиновая кислота согласно любому из вариантов осуществления 394-396, которая содержит третью область, где третья область расположена между первой областью и второй областью.

398. Нуклеиновая кислота согласно любому из вариантов осуществления 394-397, где третья область кодирует пропускаемую рибосомами последовательность.

399. Нуклеиновая кислота согласно варианту осуществления 397 или 398, где третья область кодирует пептидную последовательность tPT2A, например последовательность в соответствии SEQ ID NO: 124.

400. Нуклеиновая кислота согласно любому из вариантов осуществления 397-399, где третья аминокислотная область кодирует расщепляемую протеазой пептидную последовательность, например саморасщепляющуюся пептидную последовательность, например саморасщепляющуюся пептидную последовательность T2A, например последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 95.

401. Нуклеиновая кислота согласно любому из вариантов осуществления 397-400, где третья аминокислотная область кодирует расщепляемую протеазой пептидную последовательность, например саморасщепляющуюся пептидную последовательность,

например пептидную последовательность тандема 2A, например пептидную последовательность tPT2A, например последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 124.

402. Нуклеиновая кислота согласно любому из вариантов осуществления 394-401, где

первый репрессор экспрессии содержит аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 30, 129 или последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95 или 99% идентичностью с ней; и

второй репрессор экспрессии содержит аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 24, 142 или последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95 или 99% идентичностью с ней.

403. Нуклеиновая кислота согласно любому из вариантов осуществления 394-401, где

первый репрессор экспрессии содержит аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 30, 129 или последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95 или 99% идентичностью с ней; и

второй репрессор экспрессии содержит аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 177, 179, 183 или 185 или последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95 или 99% идентичностью с ней.

404. Нуклеиновая кислота согласно любому из вариантов осуществления 394-403, которая кодирует аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 91, 92, 121, 122 или последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95 или 99% идентичностью с ней, или последовательность, которая имеет не более чем 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 положение, отличающееся от нее.

405. Нуклеиновая кислота согласно любому из вариантов осуществления 394-404, которая кодирует аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 181, 182, 187, 188 или последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95 или 99% идентичностью с ней, или последовательность, которая имеет не более чем 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 положение, отличающееся от нее.

406. Нуклеиновая кислота согласно любому из вариантов осуществления 394-405, которая содержит нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 93, 94, 112 или 113 или последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95 или 99% идентичностью с ней, или последовательность, которая имеет не более чем 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 положение, отличающееся от нее.

407. Нуклеиновая кислота согласно любому из вариантов осуществления 394-406, которая содержит нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 196, 197 или последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95 или 99% идентичностью с ней, или последовательность, которая имеет не более чем 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 положение, отличающееся от нее.

408. Нуклеиновая кислота, содержащая последовательность, кодирующую

репрессор экспрессии или систему репрессоров экспрессии согласно любому из вариантов осуществления 1-407.

409. Нуклеиновая кислота согласно любому из вариантов осуществления 394-408, которая представляет собой РНК, например mRNA.

410. Нуклеиновая кислота согласно любому из вариантов осуществления 394-409, которая содержит N7-метилированный гуанозин, например, связанный с 5'-концом РНК, например, посредством обратной 5'-5'-трифосфатной связи.

411. Нуклеиновая кислота согласно любому из вариантов осуществления 394-410, которая содержит 5'-UTR.

412. Нуклеиновая кислота согласно любому из вариантов осуществления 394-411, которая содержит последовательность Kozak, например, между 5'-UTR и последовательностью, кодирующей репрессор экспрессии.

413. Система, содержащая

первую нуклеиновую кислоту, содержащую последовательность, кодирующую первый репрессор экспрессии системы согласно любому из вариантов осуществления 118-393; и

вторую нуклеиновую кислоту, содержащую последовательность, кодирующую второй репрессор экспрессии, например второй репрессор экспрессии системы согласно любому из вариантов осуществления 118-393.

414. Система согласно варианту осуществления 413, где первая нуклеиновая кислота содержит нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 63, 130 или последовательностью, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95 или 99% идентичностью с ней, или последовательность, которая имеет не более чем 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 положение, отличающееся от нее, а вторая нуклеиновая кислота содержит нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 57 или последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95 или 99% идентичностью с ней, или последовательность, которая имеет не более чем 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 положение, отличающееся от нее.

415. Система согласно варианту осуществления 414, где первая нуклеиновая кислота содержит нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 63, 130 или последовательностью, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95 или 99% идентичностью с ней, или последовательность, которая имеет не более чем 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 положение, отличающееся от нее, а вторая нуклеиновая кислота содержит нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 189 или 194 или последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95 или 99% идентичностью с ней, или последовательность, которая имеет не более чем 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 положение, отличающееся от нее.

416. Система согласно варианту осуществления 415, где первая нуклеиновая кислота содержит нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO:189, 194 или

последовательностью, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95 или 99% идентичностью с ней, или последовательность, которая имеет не более чем 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 положение, отличающееся от нее, а вторая нуклеиновая кислота содержит нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 63, 130 или последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95 или 99% идентичностью с ней, или последовательность, которая имеет не более чем 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 положение, отличающееся от нее.

417. Нуклеиновая кислота или система согласно любому из вариантов осуществления 394-416, где нуклеиновая кислота предусматривает mRNA.

418. Вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую систему или репрессор экспрессии согласно любому из предыдущих вариантов осуществления.

419. Липидная наночастица, содержащая систему, нуклеиновую кислоту, mRNA или вектор согласно любому из предыдущих вариантов осуществления.

420. Липидная наночастица согласно варианту осуществления 419, содержащая ионизируемый липид, например катионный липид, например MC3, SSOP.

421. Липидная наночастица согласно варианту осуществления 419 или 420, дополнительно содержащая один или несколько из нейтральных липидов, ионизируемых аминосодержащих липидов, биоразлагаемых алкиновых липидов, стероидов, фосфолипидов, полиненасыщенных липидов, структурных липидов (например, стеролов), PEG, холестерина или липидов, конъюгированных с полимером.

422. Реакционная смесь, содержащая репрессор экспрессии, систему, нуклеиновую кислоту, вектор или липидную наночастицу согласно любому из предыдущих вариантов осуществления.

423. Реакционная смесь согласно варианту осуществления 422, дополнительно содержащая клетку.

424. Фармацевтическая композиция, содержащая репрессор экспрессии, систему, нуклеиновую кислоту, вектор, липидную наночастицу или реакционную смесь согласно любому из предыдущих вариантов осуществления.

425. Способ снижения уровня экспрессии гена MYC в клетке, при этом способ, включает

приведение клетки (например, раковой клетки) в контакт с репрессором экспрессии, системой, одной или несколькими нуклеиновыми кислотами, кодирующими указанную систему или репрессор экспрессии, вектором, липидной наночастицей или фармацевтической композицией согласно любому из вариантов осуществления 1-424,

тем самым обеспечивая снижение уровня экспрессии гена MYC в клетке.

426. Способ лечения рака у нуждающегося в этом субъекта, при этом способ включает

введение субъекту репрессора экспрессии, системы, нуклеиновой кислоты, вектора, липидной наночастицы или фармацевтической композиции согласно любому из

вариантов осуществления 1-424,

тем самым осуществляя лечение рака у субъекта.

427. Способ уменьшения роста опухоли у нуждающегося в этом субъекта, при этом способ включает

введение субъекту репрессора экспрессии, системы, нуклеиновой кислоты, вектора, липидной наночастицы или фармацевтической композиции согласно любому из вариантов осуществления 1-424,

тем самым обеспечивая уменьшение размера опухоли у субъекта.

428. Способ согласно варианту осуществления 427, где уменьшение роста опухоли предусматривает уменьшение объема опухоли по сравнению с объемом опухоли в начале лечения.

429. Способ согласно варианту осуществления 428, где уменьшение роста опухоли у субъекта больше по сравнению с не подвергаемым лечению субъектом.

430. Способ повышения или восстановления чувствительности рака к ингибитору киназы, например сорафенибу, при этом способ включает введение репрессора экспрессии или системы, которые описаны в данном документе, субъекту, у которого имеется рак.

431. Способ согласно варианту осуществления 430, где введение репрессора экспрессии или системы снижает $IC_{50}$ ингибитора киназы на 10%, 20%, 30% или 40%, например, в анализе жизнеспособности раковых клеток, например анализе согласно примеру 38.

432. Способ согласно варианту осуществления 430 или 431, где ингибитор киназы подавляет одну или несколько (например, все из) киназ VEGFR, PDGFR или RAF.

433. Способ повышения или восстановления чувствительности рака к ингибитору бромодомена, например ингибитору BET, например JQ1, при этом способ включает введение репрессора экспрессии, системы или нуклеиновой кислоты, которые описаны в данном документе (например, согласно любому из вариантов осуществления 1-423), субъекту, у которого имеется рак, где необязательно введение репрессора экспрессии или системы снижает $IC_{50}$ ингибитора бромодомена на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или 95%, например, в анализе жизнеспособности раковых клеток, например анализе согласно примеру 39.

434. Способ согласно варианту осуществления 433, где ингибитор бромодомена представляет собой или предусматривает JQ1, BET672 или бирабресиб.

435. Способ повышения или восстановления чувствительности рака к ингибитору MEK, например траметинибу, при этом способ включает введение репрессора экспрессии, системы или нуклеиновой кислоты, которые описаны в данном документе (например, согласно любому из вариантов осуществления 1-423), субъекту, у которого имеется рак, где необязательно введение репрессора экспрессии или системы снижает $IC_{50}$ ингибитора MEK на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или 95%, например, в анализе жизнеспособности раковых клеток, например анализе согласно примеру 51.

436. Способ согласно любому из вариантов осуществления -427-435, где

уменьшение роста опухоли у субъекта больше или сходно с уменьшением размера опухоли при лечении субъекта химиотерапевтическим средством или низкомолекулярным ингибитором MYC.

437. Способ согласно варианту осуществления 436, где химиотерапевтическое средство представляет собой сорафениб или цисплатин.

438. Способ согласно варианту осуществления 437, где низкомолекулярный ингибитор MYC представляет собой MYCi975.

439. Способ уменьшения размера опухоли у нуждающегося в этом субъекта, при этом способ включает

введение репрессора экспрессии, системы, нуклеиновой кислоты, вектора, липидной наночастицы или фармацевтической композиции по 1-424 субъекту, где уменьшение размера опухоли больше или сходно с уменьшением размера опухоли при лечении субъекта химиотерапевтическим средством.

440. Способ согласно 439, где химиотерапевтическое средство представляет собой сорафениб или цисплатин.

441. Способ согласно любому из предыдущих вариантов осуществления, где субъект не испытывает каких-либо значительных побочных эффектов по сравнению с лечением химиотерапевтическим средством или низкомолекулярным ингибитором MYC.

442. Способ согласно любому из вариантов осуществления 436-441, где химиотерапевтическое средство представляет собой сорафениб или цисплатин.

443. Способ согласно варианту осуществления 442, где низкомолекулярный ингибитор MYC представляет собой MYCi975.

444. Способ согласно любому из вариантов осуществления 426-443, где рак представляет собой рак I стадии, II стадии, III стадии или IV стадии.

445. Способ согласно любому из предыдущих вариантов осуществления, где вес тела субъекта остается приблизительно одинаковым до лечения и после лечения.

446. Способ согласно любому из предыдущих вариантов осуществления, где у субъекта не наблюдается снижения веса тела или где у субъекта наблюдается снижение веса тела на менее чем 3%, 2% или 1% по сравнению с началом лечения.

447. Способ согласно любому из предыдущих вариантов осуществления, где у субъекта не наблюдается снижения или увеличения веса тела после лечения по сравнению с весом тела субъекта до лечения.

448. Способ лечения заболевания печени у нуждающегося в этом субъекта, при этом способ включает

введение субъекту репрессора экспрессии, где репрессор экспрессии содержит нацеливающуюся функциональную группу, которая связывает локус MYC (например, транскрибируемую область MYC, промотор MYC или якорную последовательность из объединения, опосредованного якорной последовательностью (ASMC), содержащего ген MYC, или с последовательностью, проксимальной по отношению к якорной последовательности), и необязательно эффекторную функциональную группу, например

эффекторную функциональную группу, описанную в данном документе;

тем самым осуществляя лечение заболевания печени у субъекта.

449. Способ согласно варианту осуществления 447, который дополнительно включает введение субъекту второго репрессора экспрессии, при этом второй репрессор экспрессии содержит нацеливающуюся функциональную группу, которая связывается с якорной последовательностью из объединения, опосредованного якорной последовательностью (ASMC), содержащего целевой ген, например MYC, и необязательно вторую эффекторную функциональную группу, например эффекторную функциональную группу, описанную в данном документе, например KRAB;

тем самым осуществляя лечение заболевания печени у субъекта.

450. Способ лечения заболевания печени у нуждающегося в этом субъекта, при этом способ включает

введение субъекту репрессора экспрессии, системы, нуклеиновой кислоты, вектора, липидной наночастицы или фармацевтической композиции согласно любому из вариантов осуществления 1-424,

тем самым осуществляя лечение заболевания печени у субъекта.

451. Способ согласно варианту осуществления 450, где заболевание печени представляет собой хроническое заболевание печени.

452. Способ согласно варианту осуществления 450 или 451, где заболевание печени связано с вирусом или алкоголем.

453. Способ согласно любому из вариантов осуществления 450-452, где заболевание печени представляет собой гепатит или гепатоклеточную карциному.

454. Способ согласно варианту осуществления 453, где гепатоклеточная карцинома выбрана из HCC подтипа S1, HCC подтипа S2 или HCC подтипа S3.

455. Способ согласно варианту осуществления 453 или 454, где гепатоклеточная карцинома представляет собой HCC S1.

456. Способ согласно варианту осуществления 453 или 454, где гепатоклеточная карцинома представляет собой HCC S2.

457. Способ согласно любому из вариантов осуществления 450-456, где заболевание печени вызвано вирусом гепатита B или вирусом гепатита C.

458. Способ лечения заболевания легкого у нуждающегося в этом субъекта, при этом способ включает

введение субъекту репрессора экспрессии, где репрессор экспрессии содержит нацеливающуюся функциональную группу, которая связывает локус MYC (например, транскрибируемую область MYC, промотор MYC или якорную последовательность из объединения, опосредованного якорной последовательностью (ASMC), содержащего ген MYC, или с последовательностью, проксимальной по отношению к якорной последовательности), и необязательно эффекторную функциональную группу, например эффекторную функциональную группу, описанную в данном документе;

тем самым осуществляя лечение заболевания легкого у субъекта.

459. Способ согласно варианту осуществления 458, который дополнительно включает введение субъекту второго репрессора экспрессии, при этом второй репрессор экспрессии содержит нацеливающуюся функциональную группу, которая связывается с геномным локусом, расположенным в области суперэнхансера гена-мишени, например MYC, и необязательно вторую эффекторную функциональную группу, например эффекторную функциональную группу, описанную в данном документе, например KRAB;

тем самым осуществляя лечение заболевания легкого у субъекта.

460. Способ лечения заболевания легкого у нуждающегося в этом субъекта, при этом способ включает

введение субъекту репрессора экспрессии, системы, нуклеиновой кислоты, вектора, липидной наночастицы или фармацевтической композиции согласно любому из вариантов осуществления 1-424,

тем самым осуществляя лечение заболевания легкого у субъекта.

461. Способ согласно варианту осуществления 459 или 460, где заболевание легкого представляет собой рак, например рак легкого, например карциному легкого, например немелкоклеточную карциному легкого или мелкоклеточную карциному легкого.

462. Способ согласно любому из вариантов осуществления 425-461, где приведение в контакт или введение предусматривает внутривенное введение субъекту.

463. Способ согласно любому из вариантов осуществления 425-462, где приведение в контакт или введение предусматривает внутриопухолевую доставку (например, инъекцию).

464. Способ согласно любому из вариантов осуществления 425-463, где рак характеризуется повышенным уровнем экспрессии MYC по сравнению с эталонным уровнем (например, по сравнению с уровнем экспрессии MYC в эталонной клетке, например во всех остальных отношениях аналогичной нераковой клетке субъекта).

465. Способ согласно любому из вариантов осуществления 426-464, где рак характеризуется дупликацией части или всего гена MYC.

466. Способ согласно любому из вариантов осуществления 426-465, где рак выбран из колоректального рака, рака молочной железы, AML, рака предстательной железы, нейробластомы, рака легких, рака эндометрия, рака печени, лимфомы (например, лимфомы Беркитта), карциномы шейки матки или рака желудка.

467. Способ согласно любому из вариантов осуществления 426-466, где рак представляет собой рак с секрецией хорионического гонадотропина человека (hCG).

468. Способ согласно любому из вариантов осуществления 426-467, где рак представляет собой гепатокарциному.

469. Способ согласно любому из вариантов осуществления 426-468, где рак представляет собой не дающий ответ рак, например не дающую ответ гепатокарциному.

470. Способ согласно любому из вариантов осуществления 426-469, где рак представляет собой немелкоклеточную карциному легкого или мелкоклеточную карциному легкого.

471. Способ согласно любому из вариантов осуществления 426-470, где рак характеризуется сверхэкспрессией альфа-фетопротеина (AFP) (например, по сравнению с уровнем экспрессии AFP в эталонной клетке, например в остальном аналогичной нераковой клетке субъекта).

472. Способ согласно любому из вариантов осуществления 431-471, где раковые клетки характеризуются наличием суперэнхансера, например, входящего в ген MYC или входящего в объединение, опосредованное якорной последовательностью, содержащее ген MYC, где рак необязательно выбран из рака печени, колоректального рака, рака молочной железы, AML, рака предстательной железы, нейробластомы, рака легкого или рака эндометрия.

472. Способ согласно варианту осуществления 471, где репрессор экспрессии (например, второй репрессор экспрессии) связывается с якорной последовательностью из объединения, опосредованного якорной последовательностью (ASMC), содержащего ген MYC, или с последовательностью, проксимальной по отношению к якорной последовательности.

473. Способ согласно любому из вариантов осуществления 426-472, где раковые клетки характеризуются отсутствием суперэнхансера, входящего в состав гена MYC или входящего в состав объединения, опосредованного якорной последовательностью, содержащего ген MYC.

474. Способ согласно варианту осуществления 473, где репрессор экспрессии (например, первый репрессор экспрессии) связывает промотор.

475. Способ согласно любому из вариантов осуществления 426-474, где рак характеризуется наличием клеток, содержащих суперэнхансер, входящий в состав гена MYC или входящий в состав объединения, опосредованного якорной последовательностью, содержащего ген MYC, и клеток, не содержащих суперэнхансер, входящий в состав гена MYC или входящий в состав объединения, опосредованного якорной последовательностью, содержащего ген MYC.

476. Способ согласно любому из вариантов осуществления 426-475, где рак характеризуется наличием клеток, характеризующихся повышенным уровнем экспрессии MYC по сравнению с эталонным уровнем (например, по сравнению с уровнем экспрессии MYC в эталонной клетке, например аналогичной в остальном отношении нераковой клетке субъекта), и клеток, не характеризующихся повышенным уровнем экспрессии MYC по сравнению с эталонным уровнем (например, по сравнению с уровнем экспрессии MYC в эталонной клетке, например аналогичной в остальном отношении нераковой клеткой субъекта), например, имеющих нормальный уровень экспрессии MYC.

477. Способ согласно любому из вариантов осуществления 426-476, где репрессор экспрессии, систему, нуклеиновую кислоту, вектор, липидную наночастицу или фармацевтическую композицию вводят в виде монотерапии.

478. Способ согласно любому из вариантов осуществления 426-477, который включает введение субъекту множества доз репрессора экспрессии, системы, нуклеиновой

кислоты, вектора, липидной наночастицы или фармацевтической композиции, например по меньшей мере 2, 3, 4, 5 или 6 доз.

479. Способ согласно любому из вариантов осуществления 426-479, который включает введение субъекту множества доз репрессора экспрессии, системы, нуклеиновой кислоты, вектора, липидной наночастицы или фармацевтической композиции в 5-дневных интервалах.

480. Способ согласно любому из вариантов осуществления 426-479, включающий

a) во-первых, введение субъекту первого множества доз репрессора экспрессии или системы, описанных в данном документе (например, согласно любому из вариантов осуществления 1-424), где необязательно каждую последующую дозу в первом множестве вводят через 5 дней после предыдущей дозы в первом множестве;

b) во-вторых, отмену репрессора экспрессии или системы на некоторый период времени ("лекарственные каникулы"), например на приблизительно 2 недели, и

c) в-третьих, введение субъекту второго множества доз репрессора экспрессии или системы, где необязательно последующую дозу во втором множестве вводят через 5 дней после предыдущей дозы во втором множестве.

481. Способ согласно варианту осуществления 480, где первое множество доз предусматривает 4 дозы.

482. Способ согласно варианту осуществления 479 или 480, где второе множество доз предусматривает 2 дозы.

483. Способ согласно любому из вариантов осуществления 480-482, где во время лекарственных каникул субъект вообще не получает терапевтических средств.

484. Способ согласно любому из вариантов осуществления 480-483, где во время лекарственных каникул субъект получает второе терапевтическое средства.

485. Способ согласно любому из вариантов осуществления 480-484, где лекарственные каникулы по меньшей мере в два раза превышают время между введением доз в первом множестве доз.

486. Способ согласно любому из вариантов осуществления 480-486, где лекарственные каникулы по меньшей мере в два раза превышают время между введением доз во втором множестве доз.

487. Способ согласно любому из вариантов осуществления 426-486, где объем опухоли снижается до невыявляемых уровней после лечения репрессором экспрессии или системой.

488. Способ согласно любому из вариантов осуществления 426-487, где объем опухоли снижается (например, до невыявляемого уровня) после прекращения лечения репрессором экспрессии или системой.

489. Способ согласно любому из вариантов осуществления 425-488, где рак не становится устойчивым к репрессору экспрессии или системе или не становится устойчивым к репрессору экспрессии или системе в течение периода 10, 20, 30, 40, 50 или 60 дней.

490. Способ согласно любому из вариантов осуществления 425-489, где раковые клетки имеют функциональный апоптозный путь.

491. Способ согласно любому из вариантов осуществления 425-490, где раковые клетки имеют функциональную каспазу 3.

492. Способ согласно варианту осуществления 491, где уровень каспазы 3 повышается в раковых клетках при введении субъекту репрессора экспрессии или системы.

493. Способ согласно любому из вариантов осуществления 425-492, где уровень Ki67 снижается в раковых клетках при введении субъекту репрессора экспрессии или системы.

494. Способ согласно любому из вариантов осуществления 425-493, где пролиферация раковых клеток снижается при введении субъекту репрессора экспрессии или системы.

495. Способ согласно любому из вариантов осуществления 425-494, где способ дополнительно включает

a. приведение клетки в контакт со вторым терапевтическим средством или

b. введение субъекту второго терапевтического средства.

496. Способ согласно варианту осуществления 495, где второе терапевтическое средство не представляет собой репрессор экспрессии, связывающийся с промотором MYC.

497. Способ согласно варианту осуществления 495 или 496, где второе терапевтическое средство не представляет собой репрессор экспрессии, систему, гибридный белок, нуклеиновую кислоту, вектор, реакционную смесь, фармацевтическую композицию или липидную наночастицу согласно любому из вариантов осуществления 1-424.

498. Способ согласно любому из вариантов осуществления 494-496, где второе терапевтическое средство представляет собой репрессор экспрессии, систему, гибридный белок, нуклеиновую кислоту, вектор, реакционную смесь, фармацевтическую композицию или липидную наночастицу согласно любому из вариантов осуществления 1-424.

499. Способ согласно любому из вариантов осуществления 495-497, где второе терапевтическое средство представляет собой средство иммунотерапии, одно или оба из средств терапии на основе иммунных контрольных точек и ингибитора фактора роста эндотелия сосудов, средство системной химиотерапии, ингибитор тирозинкиназы, например сорафениб, ингибитор митоген-активируемой протеинкиназы (ингибитор MEK), например траметиниб, или ингибитор бромодомена, например ингибитор BET, например JQ1 или бирабресиб.

500. Способ согласно любому из вариантов осуществления 495-499, где второе терапевтическое средство представляет собой ингибитор тирозинкиназы, например сорафениб.

501. Способ согласно любому из вариантов осуществления 495-499, где второе

терапевтическое средство представляет собой ингибитор бромодомена, например ингибитор BET, например JQ1, бирабресиб или BET 672.

502. Способ согласно любому из вариантов осуществления 495-499, где второе терапевтическое средство представляет собой ингибитор митоген-активируемой протеинкиназы (ингибитор MEK), например траметиниб.

503. Способ согласно любому из вариантов осуществления 495-502, где способ дополнительно включает применение по отношению к субъекту дополнительной терапии.

504. Способ согласно варианту осуществления 504, где дополнительная терапия предусматривает хирургическую резекцию, ортотопическую трансплантацию печени, радиочастотную абляцию, фотодинамическую терапию (PDT), лазерную терапию, брахитерапию, лучевую терапию, транскатетерную артериальную химио- или радиоэмболизацию или стереотаксическую лучевую терапию.

505. Способ согласно любому из вариантов осуществления 495-504, где второе терапевтическое средство выбрано из ингибитора контрольной точки или малой молекулы.

506. Способ согласно любому из вариантов осуществления 495-505, где второе терапевтическое средство представляет собой химиотерапевтическое средство, например ингибитор киназы или ингибитор бромодомена, например ингибитор BET.

507. Способ согласно вариантам осуществления 505 или 506 где второе терапевтическое средство выбрано из сорафениба, JQ1, BET672, бирабрезиба или траметиниба.

508. Способ согласно любому из вариантов осуществления 495-506, где репрессор экспрессии, систему или нуклеиновую кислоту и второе терапевтическое средство вводят одновременно.

509. Способ согласно любому из вариантов осуществления 495-508, где репрессор экспрессии, систему или нуклеиновую кислоту и второе терапевтическое средство вводят последовательно.

509. Способ согласно любому из вариантов осуществления 503-509, где дополнительную терапию проводят одновременно.

511. Способ согласно любому из вариантов осуществления 503-510, где дополнительную терапию проводят последовательно.

512. Способ согласно любому из вариантов осуществления 495-511, где второе терапевтическое средство вводят одновременно с репрессором экспрессии, системой, нуклеиновой кислотой, вектором, липидной наночастицей, фармацевтической композицией или реакционной смесью согласно любому из вариантов осуществления 1-424.

513. Способ согласно любому из вариантов осуществления 495-512, где второе терапевтическое средство вводят последовательно с репрессором экспрессии, системой, нуклеиновой кислотой, вектором, липидной наночастицей, фармацевтической композицией или реакционной смесью согласно любому из вариантов осуществления 1-

424.

514. Способ согласно любому из вариантов осуществления 495-513, где репрессор экспрессии, систему или нуклеиновую кислоту вводят внутривенно, а вторую терапию проводят перорально.

515. Способ согласно любому из предыдущих вариантов осуществления, где рак представляет собой резистентный или рефрактерный рак.

516. Способ согласно любому из предыдущих вариантов осуществления, где рак резистентен или рефрактерен к ингибитору киназы, например ингибитору киназы, который подавляет одну или несколько из киназ VEGFR, PDGFR или RAF, например сорафенибу.

517. Способ согласно любому из предыдущих вариантов осуществления, где у субъекта имеется амплификация суперэнхансера MYC.

518. Набор, содержащий контейнер, содержащий композицию, содержащую репрессор экспрессии, систему, одну или несколько нуклеиновых кислот, кодирующих указанную систему или репрессор экспрессии, вектор, липидную наночастицу, реакционную смесь или фармацевтическую композицию согласно любому из вариантов осуществления 1-424, и набор инструкций, предусматривающий по меньшей мере один способ модулирования, например снижения, уровня экспрессии гена MYC в пределах клетки с помощью указанной композиции.

ОПРЕДЕЛЕНИЯ

***Форма единственного и множественного числа***: используемая в данном документе форма единственного числа охватывает форму множественного числа, если из контекста явно не следует иное.

***Средство***: используемый в данном документе термин "средство" может использоваться для обозначения соединения или структурной единицы любого химического класса, включая, например, полипептид, нуклеиновую кислоту, сахарид, липид, малую молекулу, металл или их комбинацию или комплекс. Как будет понятно из контекста специалистам в данной области, в некоторых вариантах осуществления термин может использоваться для обозначения структурной единицы, которая представляет собой или предусматривает клетку или организм или их фракцию, экстракт или компонент. В качестве альтернативы или дополнения, как специалисты в данной области поймут в свете контекста, в некоторых вариантах осуществления термин может использоваться для обозначения природного продукта в том смысле, что он находится в природе и/или получен из нее. В некоторых вариантах осуществления, опять же, как будет понятно специалистам в данной области в свете контекста, данный термин может использоваться для обозначения одной или нескольких структурных единиц, созданных человеком в том смысле, что она спроектирована, сконструирована и/или произведена человеком и/или не встречается в природе. В некоторых вариантах осуществления средство можно применять в выделенной или чистой форме; в некоторых вариантах осуществления средство можно применять в неочищенной форме. В некоторых вариантах осуществления потенциальные

средства могут быть представлены в виде коллекций или библиотек, например, которые могут быть подвергнуты скринингу для идентификации или характеристики в них активных средств. В некоторых вариантах осуществления термин "средство" может относиться к соединению или структурной единице, которые представляют собой или содержат полимер; в некоторых вариантах осуществления термин может относиться к соединению или структурной единице, которые содержат одну или несколько полимерных форм. В некоторых вариантах осуществления термин "средство" может относиться к соединению или структурной единице, которые не являются полимером и/или по сути не содержат никакого полимера и/или одного или нескольких конкретных полимерных функциональных групп. В некоторых вариантах осуществления термин может относиться к соединению или структурной единице, которые не содержат или по сути не содержат какой-либо полимерной функциональной группы.

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

которые могут содержать мотив связывания нуклеирующего средства (например, CTCF) в другом контексте); такие целевые якорные последовательности могут называться "якорными последовательностями-мишенями". В некоторых вариантах осуществления последовательность и/или активность якорной последовательности-мишени модулируются, в то время как последовательность и/или активность одной или нескольких других якорных последовательностей, которые могут присутствовать в одной и той же системе (например, в одной и той же клетке и/или в некоторых вариантах осуществления в одной и той же молекуле нуклеиновой кислоты, например в одной и той же хромосоме), что и целевая якорная последовательность не модулируются. В некоторых вариантах осуществления якорная последовательность содержит или представляет собой мотив связывания нуклеирующего полипептида. В некоторых вариантах осуществления якорная последовательность расположена рядом с мотивом связывания нуклеирующего полипептида.

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

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

водородных связей, взаимодействия Ван-дер-Ваальса, гидрофобных взаимодействий, притяжения и их комбинаций. В некоторых вариантах осуществления последовательность ДНК является "ассоциированной с" геномным или транскрипционным комплексом-мишенью, когда нуклеиновая кислота по меньшей мере частично находится в геномном или транскрипционном комплексе-мишени, и на экспрессию гена в последовательности ДНК влияет образование или разрушение геномного или транскрипционного комплекса-мишени.

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

***Эффекторная функциональная группа:*** используемый в данном документе термин "эффекторная функциональная группа" относится к домену, который способен изменять уровень экспрессии гена-мишени при локализации в соответствующем сайте в ядре клетки. В некоторых вариантах осуществления эффекторная функциональная группа рекрутирует компоненты механизма транскрипции. В некоторых вариантах осуществления эффекторная функциональная группа подавляет рекрутирование компонентов факторов транскрипции или факторов, репрессирующих экспрессию. В некоторых вариантах осуществления эффекторная функциональная группа предусматривает эпигенетическую модифицирующую функциональную группу (например, эпигенетически модифицирует последовательность ДНК-мишень).

***Эпигенетическая модифицирующая функциональная группа:*** Используемый в данном документе термин "эпигенетическая модифицирующая функциональная группа"

относится к домену, который изменяет i) структуру, например двумерную структуру, хроматина; и/или ii) эпигенетический маркер (например, один или несколько из метилирования ДНК, метилирования гистонов, ацетилирования гистонов, сумоилирования гистонов, фосфорилирования гистонов и связанного с РНК сайленсинга), когда эпигенетическая модифицирующая функциональная группа надлежащим образом локализована в нуклеиновой кислоте (например, с помощью нацеливающейся функциональной группы). В некоторых вариантах осуществления эпигенетическая модифицирующая функциональная группа предусматривает фермент или его функциональный фрагмент или вариант, который воздействует на один или несколько эпигенетических маркеров (например, повышает или снижает его уровень). В некоторых вариантах осуществления эпигенетическая модифицирующая функциональная группа предусматривает ДНК-метилтрансферазу, гистон-метилтрансферазу, CREB-связывающий белок (CBP) или функциональный фрагмент любого из них.

***Последовательность контроля экспрессии:*** используемый в данном документе термин "последовательность контроля экспрессии" относится к последовательности нуклеиновой кислоты, которая повышает или снижает транскрипцию гена и включает (без ограничения) промотор и энхансер. "Энхансерная последовательность" относится к подтипу последовательности контроля экспрессии и повышает вероятность транскрипции гена. "Последовательность сайленсинга или репрессора" относится к подтипу последовательности контроля экспрессии и снижает вероятность транскрипции гена.

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

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

В некоторых вариантах осуществления первый репрессор экспрессии и второй репрессор экспрессии присутствуют в одной и той же клетке одновременно. В некоторых вариантах осуществления первый репрессор экспрессии и второй репрессор экспрессии не присутствуют в одной и той же клетке одновременно, например они присутствуют последовательно. Например, первый репрессор экспрессии может присутствовать в клетке в течение первого периода времени, а затем второй репрессор экспрессии может присутствовать в клетке в течение второго периода времени, при этом первый и второй периоды времени могут быть перекрывающимися или неперекрывающимися.

***Слитая молекула*:** как используется в данном документе, термин "слитая молекула" относится к соединению, содержащему две или более функциональных групп, например нацеливающую функциональную группу и эффекторную функциональную группу, которые ковалентно связаны. Слитая молекула и ее функциональные группы могут содержать любую комбинацию из полипептида, нуклеиновой кислоты, гликана, малой молекулы или других компонентов, описанных в данном документе (например, нацеливающаяся функциональная группа может предусматривать нуклеиновую кислоту, а эффекторная функциональная группа может предусматривать полипептид). В некоторых вариантах осуществления слитая молекула представляет собой слитый белок, например, содержащий один или несколько полипептидных доменов, ковалентно связанных пептидными связями. В некоторых вариантах осуществления слитая молекула представляет собой молекулу-конъюгат, которая содержит нацеливающуюся функциональную группу и эффекторную функциональную группу, которые связаны ковалентной связью, отличной от пептидной связи или фосфодиэфирной связи (например, нацеливающуюся функциональную группу, предусматривающую нуклеиновую кислоту, и эффекторную функциональную группу, предусматривающую полипептид, связанные ковалентной связью, отличной от пептидной связи или фосфодиэфирной связи). В некоторых вариантах осуществления репрессор экспрессии представляет собой или предусматривает слитую молекулу.

***Геномный комплекс***: как используется в данном документе, термин "геномный комплекс" представляет собой комплекс, который объединяет два элемента геномной последовательности, которые разнесены друг от друга в одной или нескольких хромосомах посредством взаимодействий между множеством белков и/или других компонентов (потенциально включая элементы геномной последовательности). В некоторых вариантах осуществления элементы геномной последовательности представляют собой якорные последовательности, с которыми связывается один или несколько белковых компонентов комплекса. В некоторых вариантах осуществления геномный комплекс может содержать объединение, опосредованное якорной последовательностью. В некоторых вариантах осуществления элемент геномной последовательности может представлять собой или содержать CTCF-связывающий мотив, промотор и/или энхансер. В некоторых вариантах осуществления элемент геномной последовательности содержит по меньшей мере один или оба из промотора и/или

регуляторного сайта (например, энхансер). В некоторых вариантах осуществления образование комплексов зарождается в элементе(-ах) геномной последовательности и/или путем связывания одного или нескольких белковых компонентов с элементом(-ами) геномной последовательности. Как будет понятно специалистам в данной области, в некоторых вариантах осуществления совместная локализация (например, объединение) геномных сайтов посредством образования комплекса изменяет топологию ДНК в элементе(-ах) геномной последовательности или рядом с ним(-и), в том числе в некоторых вариантах осуществления между ними. В некоторых вариантах осуществления геномный комплекс содержит объединение, опосредованное якорной последовательностью, которое содержит одну или несколько петель. В некоторых вариантах осуществления геномный комплекс, описанный в данном документе, зарождается нуклеирующим полипептидом, таким как, например, CTCF и/или когезин. В некоторых вариантах осуществления геномный комплекс, описанный в данном документе, может содержать, например, одно или несколько из CTCF, когезина, некодирующей РНК (например, eRNA), белков механизма транскрипции (например, РНК-полимеразы, одного или нескольких факторов транскрипции, например выбранных из группы, состоящей из TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIE, TFIIF, TFIIH и т. д.), регуляторов транскрипции (например, медиатора, P300, энхансер-связывающих белков, репрессор-связывающих белков, модификаторов гистонов и т. д.) и т. д. В некоторых вариантах осуществления геномный комплекс, описанный в данном документе, содержит один или несколько компонентов полипептида и/или один или несколько компонентов нуклеиновой кислоты (например, один или несколько компонентов РНК), которые в некоторых вариантах осуществления могут взаимодействовать друг с другом и/или с одним или несколькими элементами геномной последовательности (например, якорными последовательностями, промоторными последовательностями, регуляторными последовательностями (например, энхансерными последовательностями)) таким образом, чтобы ограничить отрезок геномной ДНК топологической конфигурацией (например, петлей), которую он не принимает, когда комплекс не образуется.

***Функциональная группа***: как используется в данном документе, термин "функциональная группа" относится к определенной химической группе или структурной единице с конкретной структурой и/или активностью, которые описаны в данном документе.

***Модулирующее средство:*** как используется в данном документе, термин "модулирующее средство" относится к средству, содержащему одну или несколько нацеливающих функциональных групп и одну или несколько эффекторных функциональных групп, которые способны изменять (например, повышать или снижать) уровень экспрессии гена-мишени, например MYC.

**MYC:** как используется в данном документе, термины "локус MYC" относятся к части генома человека, которая кодирует полипептид MYC (например, полипептид, раскрытый в NCBI под номером доступа NP002458.2, или его мутант), промотору,

функционально связанному с MYC ("промотор MYC"), и якорным последовательностям, образующим ASMC, содержащее ген MYC. В некоторых вариантах осуществления локус MYC кодирует нуклеиновую кислоту с регистрационным номером NCBI NM-002467. В некоторых вариантах осуществления ген MYC представляет собой протоонкоген, а в некоторых вариантах осуществления ген MYC представляет собой онкоген. В определенных случаях ген MYC находится на хромосоме 8 в локусе 8q24.21. В определенных случаях ген MYC начинается на 128816862 п. о. от теломера короткого плеча и заканчивается на 128822856 п. о. от теломера короткого плеча. В определенных случаях размер гена MYC составляет приблизительно 6 т. о. В определенных случаях ген MYC кодирует по меньшей мере восемь отдельных последовательностей mRNA - 5 вариантов альтернативного сплайсинга и 3 варианта без сплайсинга.

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

аналогов нуклеозидов (например, 2-аминоаденозина, 2-тиотимидина, инозина, пирролопиримидина, 3-метиладенозина, 5-метилцитидина, С5-пропинилцитидина, С5-пропинилуридина, 2-аминоаденозина, С5-бромуридина, С5-фторуридина, С5-йодуридина, С5-пропинилуридина, С5-пропинилцитидина, С5-метилцитидина, 2-аминоаденозина, 7-деазааденозина, 7-деазагуанозина, 8-оксоаденозина, 8-оксогуанозина, 0(6)-метилгуанина, 2-тиоцитидина, метилированных оснований, интеркалированных оснований и их комбинаций). В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота содержит один или несколько модифицированных сахаров (например, 2'-фторрибозу, рибозу, 2'-дезоксирибозу, арабинозу и гексозу) по сравнению с природными нуклеиновыми кислотами. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота имеет нуклеотидную последовательность, которая кодирует функциональный генный продукт, такой как РНК или белок. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота содержит один или несколько интронов. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновые кислоты получают посредством одного или нескольких из выделения из природного источника, ферментативного синтеза путем полимеризации на основе комплементарной матрицы (in vivo или in vitro), размножения в рекомбинантной клетке или системе и химического синтеза. В некоторых вариантах осуществления длина нуклеиновой кислоты составляет по меньшей мере 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 1 10, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 20, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 4500, 5000 или больше остатков. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота является частично или полностью однонитевой; в некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота является частично или полностью двухнитевой. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота имеет нуклеотидную последовательность, содержащую по меньшей мере один элемент, который кодирует или представляет собой комплементарную последовательность последовательности, которая кодирует полипептид. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота характеризуется ферментативной активностью.

***Нуклеирующий полипептид***: как используется в данном документе, термин "нуклеирующий полипептид" или "нуклеирующий полипептид, образующий объединение", используемый в данном документе, относится к белку, который прямо или косвенно связывается с якорной последовательностью и может взаимодействовать с одним или несколькими нуклеирующими полипептидами, образующими объединения (которые могут взаимодействовать с якорной последовательностью или другими нуклеиновыми кислотами) с образованием димера (или структуры более высокого порядка), состоящего из двух или более таких нуклеирующих полипептидов, образующих объединения, которые могут быть или не быть идентичными друг другу. Когда нуклеирующие полипептиды, образующие объединения, связанные с отличающимися якорными последовательностями, связываются друг с другом, так чтобы отличающиеся якорные последовательности поддерживались в физической близости друг к другу,

образующаяся в результате структура представляет собой объединение, опосредованное якорной последовательностью. То есть непосредственная физическая близость взаимодействия нуклеирующего пептида-якорной последовательности с другим нуклеирующим пептидом-якорной последовательностью создает объединение, опосредованное якорной последовательностью (например, в некоторых случаях петлей ДНК), которая начинается и заканчивается якорной последовательностью. Как сразу же поймут специалисты в данной области при прочтении настоящего описания, такие термины, как "нуклеирующий полипептид", "нуклеирующая молекула", "нуклеирующий белок", "нуклеирующий белок, образующий объединение", могут иногда использоваться для обозначения нуклеирующего полипептида, образующего объединение. Как аналогичным образом сразу же поймут специалисты в данной области при прочтении настоящего описания, собранная коллекция из двух или более нуклеирующих полипептидов, образующих объединение (которые в некоторых вариантах осуществления могут включать несколько копий одного и того же средства и/или в некоторых вариантах осуществления одного или нескольких каждого из множества отличающихся средств), может называться "комплексом", "димером", "мультимером" и т. д.

***Функционально связанный***: как используется в данном документе, фраза "функционально связанный" относится к сопоставлению, в котором описанные компоненты находятся во взаимосвязи, дающей им возможность функционировать предполагаемым образом. Элемент контроля транскрипции, "*функционально связанный*" с функциональным элементом, например геном, является ассоциированным таким образом, что экспрессия и/или активность функционального элемента, например гена, достигаются в условиях, совместимых с элементом контроля транскрипции. В некоторых вариантах осуществления "*функционально связанные*" элементы контроля транскрипции являются смежными (например, ковалентно связанными) с представляющими интерес кодирующими элементами, например генами; в некоторых вариантах осуществления функционально связанные элементы контроля транскрипции действуют в *транс*-положении или иным образом на расстоянии от представляющего интерес функционального элемента, например гена. В некоторых вариантах осуществления термин "функционально связанный" означает, что две последовательности нуклеиновой кислоты входят в состав одной и той же молекулы нуклеиновой кислоты. В дополнительном варианте осуществления термин "функционально связанный" может дополнительно означать, что две последовательности нуклеиновых кислот расположены проксимально по отношению друг к другу в одной и той же молекуле нуклеиновой кислоты, например в пределах 1000, 500, 100, 50 или 10 пар оснований друг от друга или непосредственно прилегают друг к другу.

***Пептид, полипептид, белок***: как используется в данном документе, термины "пептид", "полипептид" и "белок" относятся к соединению, состоящему из аминокислотных остатков, ковалентно связанных пептидными связями или посредством связей, отличных от пептидных связей. Белок или пептид должен содержать по меньшей

мере две аминокислоты, и при этом не накладывается никаких ограничений на максимальное число аминокислот, которые могут составлять последовательность белка или пептида. Полипептиды предусматривают любой пептид или белок, содержащий две или более аминокислот, соединенных друг с другом пептидными связями или посредством связей, отличных от пептидных связей. Как используется в данном документе, термин относится как к коротким цепям, которые в уровне техники также обычно называются, например, пептидами, олигопептидами и олигомерами, так и к более длинным цепям, которые в уровне техники обычно называются белками, которых существует много типов.

***Фармацевтическая композиция:*** как используется в данном документе, термин "фармацевтическая композиция" относится к активному средству (например, модулирующему средству, например разрушающему средству), составленному вместе с одним или несколькими фармацевтически приемлемыми носителями. В некоторых вариантах осуществления активное средство присутствует в количестве стандартной дозы, подходящем для введения по терапевтической схеме, которая демонстрирует статистически значимую вероятность достижения заранее определенного терапевтического эффекта при введении соответствующей популяции. В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции могут быть специально составлены для введения в твердой или жидкой форме, включая те, которые адаптированы для следующего: перорального введения, например капли (водные или неводные растворы или суспензии), таблетки, например те, которые предназначены для трансбуккального, подъязычного и системного поглощения, пилюли, порошки, гранулы, пасты для нанесения на язык; парентерального введения, например подкожная, внутримышечная, внутривенная или эпидуральная инъекция в виде, например, стерильных раствора, или суспензии, или состава с замедленным высвобождением; местного применения, например в виде крема, мази, пластыря или спрея с контролируемым высвобождением, наносимых на кожу, в легкие или ротовую полость; введения интравагинально или интраректально, например в виде пессария, крема или пены; введения сублингвально; через глаза; трансдермально или назально в легкие и/или на поверхности других слизистых оболочек.

***Проксимальный***: как используется в данном документе, термин "проксимальный" относится к близости двух сайтов, например сайтов нуклеиновой кислоты, так что связывание репрессора экспрессии в первом сайте и/или модификация первого сайта репрессором экспрессии будут давать такой же или по сути такой же эффект, как и связывание и/или модификация другого сайта. Например, нацеливающаяся функциональная группа может связываться с первым сайтом, проксимальным по отношению к энхансеру (второму сайту), и эффекторная функциональная группа, ассоциированная с указанной нацеливающейся функциональной группой, может эпигенетически модифицировать первый сайт таким образом, что эффект энхансера в отношении экспрессии гена-мишени модифицируется по сути так же, как если бы второй сайт (энхансерная последовательность) был связан и/или модифицирован. В некоторых

вариантах осуществления сайт, проксимальный по отношению к гену-мишени (например, экзону, интрону или сайту сплайсинга в гене-мишени), проксимальный по отношению к элементу контроля транскрипции, функционально связанному с геном-мишенью, или проксимальный по отношению к якорной последовательности, расположен на расстоянии менее чем 5000, 4000, 3000, 2000, 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100, 50 или 25 пар оснований от гена-мишени (например, экзона, интрона или сайта сплайсинга в пределах гена-мишени), элемента контроля транскрипции или якорной последовательности (и необязательно по меньшей мере 20, 25, 50, 100, 200 или 300 пар оснований от гена-мишени (например, экзона, интрона или сайта сплайсинга в пределах гена-мишени), элемента контроля транскрипции или якорной последовательности).

***Специфический***: как используется в данном документе, термин "специфический", относящийся к средству, обладающему активностью, понимается специалистами в данной области как означающий, что средство различает потенциальные структурные единицы-мишени или состояния. Например, в некоторых вариантах осуществления считается, что средство связывается "специфически" со своей мишенью, если оно предпочтительно связывается с этой мишенью в присутствии одной или нескольких конкурирующих альтернативных мишеней. В некоторых вариантах осуществления специфическое взаимодействие зависит от наличия конкретного структурного признака структурной единицы-мишени (например, эпитопа, углубления, сайта связывания). Следует понимать, что специфичность не обязательно должна быть абсолютной. В некоторых вариантах осуществления специфичность может быть оценена относительно специфичности связывающего средства в отношении одного или нескольких других потенциальных структурных единиц-мишеней (например, конкурентов). В некоторых вариантах осуществления специфичность оценивают по сравнению со специфичностью эталонного специфического связывающего средства. В некоторых вариантах осуществления специфичность оценивают по сравнению со специфичностью эталонного неспецифического связывающего средства. В некоторых вариантах осуществления средство или структурная единица не связываются обнаруживаемым образом с конкурирующей альтернативной мишенью в условиях связывания с их структурной единицей-мишенью. В некоторых вариантах осуществления связывающее средство связывается с более высокой скоростью ассоциации, более низкой скоростью диссоциации, повышенной аффинностью, сниженной диссоциацией и/или повышенной стабильностью со своей структурной единицей-мишенью по сравнению с конкурирующей(-ими) альтернативной(-ыми) мишенью(-ями).

***Специфическое связывание:*** как используется в данном документе, термин "специфическое связывание" относится к способности различать между возможными партнерами по связыванию в окружающей среде, в которой должно происходить связывание. В некоторых вариантах осуществления связывающее средство, которое взаимодействует с одной конкретной мишенью, когда присутствуют другие потенциальные мишени, называется "*специфически связывающимся*" с мишенью, с

которой оно взаимодействует. В некоторых вариантах осуществления специфическое связывание оценивают путем выявления или определения степени ассоциации между связывающим средством и его партнером; в некоторых вариантах осуществления специфическое связывание оценивают путем выявления или определения степени диссоциации комплекса связывающее средство-партнер. В некоторых вариантах осуществления специфическое связывание оценивают путем выявления или определения способности связывающего средства конкурировать с альтернативным взаимодействием между его партнером и другой структурной единицей. В некоторых вариантах осуществления специфическое связывание оценивают, выполняя такие выявления или определения в диапазоне концентраций.

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

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

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

***Ген-мишень:*** как используется в данном документе, термин "ген-мишень" означает ген, который подвергается целенаправленному воздействию для модуляции, например экспрессии. В некоторых вариантах осуществления ген-мишень является частью целевого геномного комплекса (например, гена, который содержит по меньшей мере часть его геномной последовательности в виде части геномного комплекса-мишени, например внутри объединения, опосредованного якорной последовательностью), при этом данный геномный комплекс подвергается целенаправленному воздействию со стороны одного или

нескольких модулирующих средств, описанных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления модуляция предусматривает подавление экспрессии гена-мишени. В некоторых вариантах осуществления ген-мишень модулируют путем приведения в контакт гена-мишени или элемента контроля транскрипции, функционально связанного с геном-мишенью, с системой репрессии экспрессии, например репрессором(-ами) экспрессии, описанной в данном документе. В некоторых вариантах осуществления ген-мишень аберрантно экспрессируется (например, чрезмерно экспрессируется) в клетке, например клетке у субъекта (например, пациента).

***Нацеливающаяся функциональная группа***: как используется в данном документе, термин "нацеливающаяся функциональная группа" означает средство или структурную единицу, которые специфически целенаправленно воздействуют, например связывают, элемент геномной последовательности (например, последовательность контроля экспрессии или якорную последовательность). В некоторых вариантах осуществления элемент геномной последовательности расположен проксимально по отношению к гену-мишени (например, MYC) и/или функционально связан с ним.

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

***Терапевтически эффективное количество:*** как используется в данном документе, термин "терапевтически эффективное количество" означает количество вещества (например, терапевтического средства, композиции и/или состава), которое вызывает требуемый биологический ответ при введении в виде части терапевтической схемы. В некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективное количество вещества представляет собой количество, достаточное при введении субъекту, страдающему заболеванием, нарушением и/или состоянием или предрасположенному к ним, для лечения, постановки диагноза, предупреждения и/или отсрочки возникновения заболевания, нарушения и/или состояния. Как будет понятно специалистам средней квалификации в данной области, эффективное количество вещества может варьироваться

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

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

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

На фиг. 1A изображено схематическое представление подхода с двумя мишенями, основанного на устойчивом блокировании промотора MYC с помощью DBD, слитого с ДНК-метилтрансферазой, и неустойчивом (48/72 часа) блокировании сайтов CTCF/TF с помощью DBD или DBD, слитого с краткосрочным эффектором.

На фиг. 1B изображена локализация направляющей РНК и хроматиновый контекст сайтов-мишеней (CTCF и промотора) для гена MYC. Сверху вниз на графиках представлены локус MYC в клетках HepG2, уровни H3K4me3 (триметилирование Ky гистона H3); уровни H3K9me3 (триметилирование K9 гистона H3) (повтор 1); уровни H3K9me3 (триметилирование K9 гистона H3) (повтор 2); уровни H3K27me3 (триметилирование K27 гистона H3); уровни H3K27ac (ацетилирование K27 гистона H3); уровни GROseq_fwdStrand (связывание транскрипционно активной РНК-полимеразы II на прямой нити); уровни GROseq_revStrand (связывание транскрипционно активной РНК-полимеразы II на обратной нити); уровни RNAseq_rep2 (уровни транскриптов MYC, измеренные с помощью RNAseq, повтор 2); уровень метилирования ДНК, измеренный с помощью WGBS (полногеномное бисульфитное секвенирование), и уровни связывания CTCF. Положения четырех gRNA указаны стрелками. gRNA GD-28859, GD-28616, GD-28862 нацелены на якорный сайт, который расположен выше MYC, или нацелены рядом с ним, а gRNA GD-28617 нацелена на промотор MYC. В настоящем изобретении GD-28859 также упоминается как GD-59; GD-28616 также упоминается как GD-16; GD-28862 также упоминается как GD-62; и GD-28617 также упоминается как GD-17.

На фиг. 1C продемонстрирована схематическая диаграмма иллюстрационной бицистронной конструкции. 5'-Конец конструкции имеет кэп-структуру, определяемую

N7-метилированным гуанозином, связанным с первым нуклеотидом mRNA посредством обратной 5′-5′-трифосфатной связи. В некоторых вариантах осуществления кэп-структура способствует трансляции и стабильности белка. Ниже кэп-структуры находится нетранслируемая область (5'-UTR), предназначенная для стимуляции высоких уровней трансляции белка, после которой идет каноническая последовательность "Kozak", которая распознается рибосомой для начала трансляции белка. После последовательности "Kozak" находится CDS, которая представляет собой единую непрерывную последовательность, содержащую первый репрессор экспрессии, содержащий первую нацеливающуюся функциональную группу и первую эффекторную функциональную группу, и второй репрессор экспрессии, содержащий вторую нацеливающуюся функциональную группу и вторую эффекторную функциональную группу, разделенные посредством "пропускаемой рибосомами" последовательности tPT2A (линкером). Без ограничения какой-либо теорией, при достижении рибосомой линкера tPT2A она начинает транслировать линкер в аминокислоты. Первые 18 аминокислот, продуцированные с линкера P2A, остаются на C-конце первого репрессора экспрессии (например, содержащего DBD ZF и MQ1), который затем высвобождается рибосомой. Затем рибосома продолжает продвигаться до тех пор, пока не достигнет линкера T2A, и транслируются и высвобождаются первые 17 остатков линкера T2A. Затем транслируется второй полипептид, содержащий одну аминокислоту, а затем начало второго репрессора экспрессии (например, содержащего второй DBD с ZF и KRAB). После CDS идет 3'-UTR, которая предназначена для обеспечения высоких уровней трансляции, а также для стабилизации mRNA. Наконец, на самом 3'-конце mRNA находится поли-A--хвост. В некоторых вариантах осуществления поли-A-хвост способствует трансляции белка и стабильности mRNA.

На фиг. 2A продемонстрировано, что редактирование мотива CTCF с помощью нуклеазы Cas9 приводит к снижению уровня экспрессии MYC. Разрушение мотива CTCF с помощью Cas9 (в комбинации с GD-28616) приводило к снижению уровня экспрессии MYC на 32-39% во всех трех линиях клеток HCC (HepG2, Hep3B и SKHEP1). Разрушение области, смежной по отношению к мотиву CTCF (GD-28859), регулировало уровень экспрессии MYC на 35-45% в двух (HepG2 и Hep3B) из трех линий клеток.

На фиг. 2B продемонстрировано, что эффективность редактирования, оцененная с помощью AmpSeq, подтверждала 77-100% редактирования всех линий клеток.

На фиг. 3 продемонстрировано, что dCas9-KRAB снижает уровень экспрессии MYC, когда направлен на промотор или связанный с ним мотив CTCF. LNP-опосредованная трансфекция dCas9-KRAB/GD-28616 снижала уровень экспрессии MYC на 11-34% в моменты времени 48/72 часа у Hep3B и SKHEP1. LNP-опосредованная трансфекция dCas9-KRAB/GD-28859 снижала уровень экспрессии MYC на 18-44% в моменты времени 48/72 часа у 3 моделей HCC. Направление dCas9-KRAB на промотор MYC посредством dCas9-KRAB/GD-28617 снижало уровень экспрессии MYC на 24-58% в моменты времени 48/72 часа у 3 моделей HCC.

На фиг. 4A изображена локализация sgRNA и структура "цинковых пальцев" на

связанном с промотором мотиве CTCF. На фигуре раскрыта SEQ ID NO: 208.

На фиг. 4B продемонстрировано, что конструкции ZF-KRAB, направленные на связанный с промотором CTCF, вызывали снижение уровня активности MYC в Hep3B. ZF2-KRAB, ZF3-KRAB и ZF4-KRAB снижали уровень активности MYC в эквивалентной или большей степени, чем dCas9-KRAB/GD-28859 в клетках Hep3B, при этом ZF3-KRAB обладал наиболее сильным снижающим уровень активности эффектом.

На фиг. 4C продемонстрировано, что ZF3-неэффектор и ZF3-KRAB снижают уровень экспрессии MYC в нескольких моделях HCC человека (HepG2, Hep3B и SKHEP1). Также было показано, что ZF3-KRAB снижает уровень активности MYC в эквивалентной или большей степени, чем ZF3-неэффектор и ZF5-неэффектор в двух других моделях HCC, т. е. HepG2 и SKHEP1.

На фиг. 4D продемонстрировано, что ZF3-неэффектор и ZF3-KRAB демонстрировали эквивалентные эффекты в отношении экспрессии и жизнеспособности MYC в клетках Hep3B в разные моменты времени (24 часа, 72 часа и 120 часов).

На фиг. 5 продемонстрировано, что dCas9-MQ1 снижал уровень экспрессии MYC, когда был направлен на промотор MYC, в нескольких моделях HCC (HepG2, Hep3B и SKHEP1).

На фиг. 6A изображена локализация sgRNA и структура "цинковых пальцев" на промоторе MYC. На фигуре раскрыта SEQ ID NO: 209.

На фиг. 6B изображены 6 конструкций ZF-MQ1, направленные на промотор MYC, которые были подвергнуты скринингу в отношении эффектов, оказываемых на снижение уровня активности MYC в Hep3B. ZF8-MQ1, ZF9-MQ1 и ZF11-MQ1 снижали уровень активности MYC в наибольшей степени в клетках Hep3B, при этом ZF9-KRAB MQ1 обладал наиболее сильным снижающим уровень активности эффектом.

На фиг. 7A продемонстрировано, что ZF9-MQ1 значительно снижает уровень экспрессии MYC и снижает жизнеспособность Hep3B по сравнению с ZF12-MQ1.

На фиг. 7B продемонстрировано, что ZF9-MQ1 значительно снижает уровень экспрессии MYC и снижает жизнеспособность HepG2 по сравнению с ZF12-MQ1.

На фиг. 7C продемонстрировано, что ZF9-MQ1 значительно снижает уровень экспрессии MYC и снижает жизнеспособность SKHEP1 по сравнению с ZF12-MQ1.

На фиг. 7D продемонстрировано, что ZF9-MQ1 более эффективно снижает уровень экспрессии MYC и снижает жизнеспособность Hep3B по сравнению с ZF8-MQ1.

На фиг. 7E продемонстрировано, что ZF9-MQ1 более эффективно снижает уровень экспрессии MYC и снижает жизнеспособность HepG2 по сравнению с ZF8-MQ1.

На фиг. 7F продемонстрировано, что ZF9-MQ1 более эффективно снижает уровень экспрессии MYC и снижает жизнеспособность SKHEP1 по сравнению с ZF8-MQ1.

На фиг. 7G продемонстрировано, что ZF9-MQ1 значительно снижает уровень экспрессии MYC и снижает жизнеспособность Hep3B по сравнению с dCas9-MQ1/GD17.

На фиг. 7H продемонстрировано, что ZF9-MQ1 значительно снижает уровень экспрессии MYC и снижает жизнеспособность HepG2 по сравнению с dCas9-MQ1/GD17.

На фиг. 7I продемонстрировано, что ZF9-MQ1 значительно снижает уровень экспрессии MYC и снижает жизнеспособность SKHEP1 по сравнению с dCas9-MQ1/GD17.

На фиг. 8A продемонстрировано, что dCas9-MQ1 вызывал снижение уровня mRNA на 50-90% через 72 часа в трех линиях клеток (Hep3B, HepG2 и SKHEP1).

На фиг. 8B продемонстрировано, что снижение уровня активности MYC резко снижало жизнеспособность HepG2 и Hep3B через 72 и 168 часов, хотя снижение уровня активности MYC минимально влияло на жизнеспособность SK-HEP-1.

На фиг. 8C продемонстрировано, что на день 7 и день 11 уровень mRNA MYC снижался на ~70% и ~55%, соответственно. Вплоть до дня 15 сохранялось ~40% снижение уровня транскрипта.

На фиг. 8D продемонстрировано, что такая обработка посредством dCas9-MQ1/GD-28617 направляет метилирование de novo в целевую область и что эти транскрипционные изменения тесно коррелируют с процентом метилирования CpG в области-мишени, а подтвержденное метилирование сохраняется до дня 15.

На фиг. 9 продемонстрировано, что обработка посредством dCas9-MQ1/GD-17 подавляла рост опухоли in vivo.

На фиг. 10 продемонстрировано, что dCas9-MQ1/GD-17 снижает уровень активности MYC в контексте инфекции, вызванной гепатитом B, в гепатоцитах человека.

На фиг. 11 продемонстрировано, что нацеливание эффектора KRAB (либо неэффектора или NE), слитого с доменом по типу "цинкового пальца", на вышележащую область, непосредственно смежную к мотиву CTCF (ZF3-NE или ZF3-KRAB), и нацеливание эффектора MQ1, слитого с доменами по типу "цинкового пальца", на промотор MYC (ZF9-MQ1) снижали уровень экспрессии mRNA MYC1.

На фиг. 12 продемонстрировано, что ZF3-KRAB плюс ZF9-MQ1 снижали уровень активности MYC в большей степени, чем ZF9-MQ1 отдельно или комбинация ZF3-NE плюс ZF9-MQ1.

На фиг. 13A продемонстрировано, что ZF9-MQ1, предназначенный для связывания и нацеливания на промотор MYC, вносили в множественной концентрации в пять линий клеток HCC, т. е. Hep3B, HepG2, SKHEP1, SNU-182 и SNU-449.

На фиг. 13B-F продемонстрировано, что ZF9-MQ1 снижал уровень экспрессии MYC и снижал жизнеспособность во всех пяти протестированных линиях клеток HCC, а ZF9-MQ1 снижал уровень экспрессии MYC со средним значением EC50, составляющим 0,028 мкг/мл LNP/mRNA, с ~10-кратно более высоким медианным эффектом EC50, оказываемым на жизнеспособность (0,13 мкг/мл) in vitro через 72 часа в линии клеток HepG2.

На фиг. 14 продемонстрировано, что ZF9-MQ1 был способен значительно снижать рост опухоли (начиная с дня 6) по сравнению с мышами, обработанными контролем PBS, и ZF9-MQ1 снижал рост опухоли больше, чем низкомолекулярный препарат сравнения (MYCi975) (A). ZF9-MQ1 оказывал минимальный эффект на общий вес животного по

сравнению с PBS или MYCi975 (B).

На фиг. 15A продемонстрировано, что комбинация ZF9-MQ1 и ZF3-KRAB в дозе 1,5 мг/кг каждые 5 дней в течение 2 доз, 3 мг/кг каждые 5 дней в течение 3 доз, 3 мг/кг каждые 3 дня в течение 1 дозы уменьшала рост опухоли на уровне, сопоставимом с сорафенибом.

На фиг. 15B продемонстрировано, что обработка комбинацией ZF9-MQ1 и ZF3-KRAB оказывала минимальный эффект на общий вес животного по сравнению с эффектом, оказываемым на общий вес животного при обработке сорафенибом.

На фиг. 16A продемонстрировано, что ZF9-MQ1 (начиная с дня 13) и совместный состав ZF9-MQ1 и ZF3-KRAB (начиная с дня 6) в дозе 1 мг/кг были способны значительно снижать рост опухоли по сравнению с мышами, которых обрабатывали отрицательным контролем.

На фиг. 16B продемонстрировано, что ZF9-MQ1 по отдельности и совместный состав ZF9-MQ1 и ZF3-KRAB в дозе 3 мг/кг были способны снижать рост опухоли по сравнению с мышами, которых обрабатывали отрицательным контролем.

На фиг. 16C продемонстрировано, что совместный состав ZF9-MQ1 и ZF3-KRAB был способен снижать рост опухоли на таком же или более высоком уровне, что и цисплатин или низкомолекулярный препарат сравнения (MYCi975) как при дозе 1 мг/кг, так и при дозе 3 мг/кг.

На фиг. 16D продемонстрировано, что обработка совместным составом ZF9-MQ1 и ZF3-KRAB как при дозе 1 мг/кг, так и при дозе 3 мг/кг оказывала минимальный эффект на общий вес животного по сравнению с эффектом, оказываемым на общий вес животного при обработке либо цисплатином, либо MYCi975.

На фиг. 17A продемонстрировано, что ZF9-MQ1 снижал уровень mRNA MYC более чем на 80% в линии клеток A549 через 120 часов после обработки.

На фиг. 17B продемонстрировано, что ZF9-MQ1 снижал уровень mRNA MYC более чем на 80% в линии клеток NCI-H2009 через 120 часов после обработки.

На фиг. 17C продемонстрировано, что ZF9-MQ1 снижал уровень mRNA MYC более чем на 80% в линии клеток NCI-H358 через 120 часов после обработки.

На фиг. 17D продемонстрировано, что ZF9-MQ1 снижал уровень mRNA MYC более чем на 80% в линии клеток HCC95 через 72 часа после обработки.

На фиг. 17E продемонстрировано, что ZF9-MQ1 вызывал потерю жизнеспособности клеток в линии клеток A549 через 120 часов после обработки.

На фиг. 17F продемонстрировано, что ZF9-MQ1 вызывал потерю жизнеспособности клеток в линии клеток NCI-H2009 через 120 часов после обработки.

На фиг. 17G продемонстрировано, что ZF9-MQ1 вызывал потерю жизнеспособности клеток в линии клеток NCI-H358 через 120 часов после обработки.

На фиг. 17H продемонстрировано, что ZF9-MQ1 вызывал потерю жизнеспособности клеток в линии клеток HCC95 через 72 часа после обработки.

На фиг. 18A продемонстрировано, что через 96 часов после обработки

приблизительно ~17,5% клеток были апоптозными в необработанной популяции клеток.

На фиг. 18B продемонстрировано, что через 96 часов после обработки приблизительно ~18% клеток были апоптозными в популяции клеток, обработанной посредством ZF9-NE.

На фиг. 18C продемонстрировано, что через 96 часов после обработки приблизительно ~38,9% клеток были апоптозными в популяции клеток, обработанной посредством ZF9-MQ1.

На фиг. 18D продемонстрировано, что через 96 часов после обработки приблизительно ~38,9% клеток были апоптозными в популяции клеток, обработанной ZF9-MQ1, в отличие от ~18% апоптозных клеток как в необработанных клетках, так и в популяции клеток, обработанной посредством ZF9-NE, что указывает на то, что ZF9-MQ1 способен индуцировать клеточный апоптоз клеток рака легкого.

На фиг. 19 A и B продемонстрирован ZF9-MQ1 со сниженным уровнем активности MYC с EC50, составляющей 0,08 мкг/мл LNP/mRNA, с ~25-кратно более высоким эффектом EC50 на жизнеспособность (2 мкг/мл) in vitro через 72 часа в этих линиях клеток A549 (фиг. 19A) и HCC95 (фиг. 19B).

На фиг. 20A и B продемонстрировано, что обработка посредством ZF9-MQ1 снижает уровни белка MYC более чем на 80% через 96 часов после обработки в линиях раковых клеток легкого.

На фиг. 21 продемонстрировано, что ZF9-MQ1 был способен значимо снижать рост опухоли (начиная с дня 8) по сравнению с мышами, обработанными контролем PBS. Также было замечено, что ZF9-MQ1 оказывал минимальный эффект на общий вес животных.

На фиг. 22 продемонстрировано, что направляющая РНК GD-29833 и 29914 может эффективно снижать уровни mRNA MYC при доставке с эффекторной mRNA dCAS9-KRAB с помощью доставки в LNP с SSOP, что подчеркивает способность снижать уровень активности онкогенного MYC при применении данного дистального регуляторного элемента.

На фиг. 23 продемонстрировано, что направляющая РНК GD-29833 и 29914 может эффективно снижать уровни mRNA MYC при доставке с эффекторной mRNA dCAS9-KRAB с помощью доставки в LNP с MC3, что подчеркивает способность снижать уровень активности онкогенного MYC при применении данного дистального регуляторного элемента.

На фиг. 24A продемонстрировано, что направляющая РНК GD-29833 и 29914 может эффективно снижать уровни mRNA MYC при доставке со всеми 3 эффекторными белками (EZH2, EZH2-KRAB и MQ1) в линии клеток A549.

На фиг. 24B продемонстрировано, что направляющая РНК GD-29833 и 29914 может эффективно снижать уровни mRNA MYC при доставке со всеми 3 эффекторными белками (EZH2, EZH2-KRAB и MQ1) в линии клеток NCI-H2009.

На фиг. 25A продемонстрировано, что направляющая РНК GD-29833 и 29914,

доставляемая с помощью KRAB или MQ1, может значимо снижать уровни mRNA MYC в линии клеток A549 через 120 часов после обработки.

На фиг. 25B продемонстрировано, что направляющая РНК GD-29833 и 29914, доставляемая с помощью KRAB или MQ1, может значимо снижать уровни mRNA MYC в линии клеток NCI-H2009 через 120 часов после обработки, и данное снижение уровней сопоставимо со снижением, наблюдаемым после обработки посредством ZF9-MQ1.

На фиг. 26A продемонстрировано, что dCas9-MQ1 увеличивал метилирование сайта-мишени в клетках NSCLC приблизительно до 60%.

На фиг. 26B продемонстрировано, что dCas9-MQ1 управлял метилированием в дистальной промоторной области (увеличивал приблизительно до 50%).

На фиг. 27A-B продемонстрировано, что направление направляющих молекул на суперэнхансер легкого MYC репрессорами транскрипции снижает уровни белка MYC через 96 часов в линиях раковых клеток легкого NCI-H2009.

На фиг. 28A продемонстрировано, что присутствие белка ZF9-MQ1 в лизате цельных клеток постепенно снижается после обработки клетки Hep3B посредством ZF9-MQ1.

На фиг. 28B продемонстрировано, что экспрессия белка MYC в лизате цельных клеток постепенно снижается после обработки клетки Hep3B посредством ZF9-MQ1.

На фиг. 28C продемонстрировано, что присутствие белка ZF9-MQ1 в лизате цельных клеток коррелирует со снижением уровня белка MYC после обработки клетки Hep3B посредством ZF9-MQ1.

На фиг. 29A продемонстрировано снижение уровня экспрессии mRNA с 45% снижением уровня транскрипта MYC в нескольких моментах времени вплоть до дня 15 в линии клеток SK-HEP после обработки посредством ZF9-MQ1.

На фиг. 29B продемонстрировано, что транскрипционные изменения MYC коррелируют с процентом метилирования до дня 15.

На фиг. 30A продемонстрировано, что первичные гепатоциты, обработанные посредством ZF9-MQ1, ZF9-MQ1+ZF3-KRAB или бицистронной ZF9-MQ1_ZF3-KRAB в концентрациях 0,6 мкг/мл, 1,25 мкг/мл и 2,5 мкг/мл, демонстрировали снижение экспрессии mRNA MYC по сравнению с GFP, ZF-NE или ZF3-KRAB по отдельности.

На фиг. 30B продемонстрировано, что обработка посредством ZF9-MQ1, ZF9-MQ1+ZF3-KRAB или бицистронной ZF9-MQ1_ZF3-KRAB в концентрациях 0,6 мкг/мл, 1,25 мкг/мл и 2,5 мкг/мл оказывала минимальный эффект на жизнеспособность. первичных гепатоцитов, демонстрируя, что снижение экспрессии MYC менее значимо для нормальных клеток по сравнению с линиями клеток HCC.

На фиг. 30C продемонстрировано, что первичные гепатоциты, обработанные посредством ZF9-MQ1, ZF9-MQ1+ZF3-KRAB или бицистронной ZF9-MQ1_ZF3-KRAB в концентрациях 0,5 мкг/мл, 1,0 мкг/мл и 2,0 мкг/мл, демонстрировали снижение экспрессии mRNA MYC по сравнению с GFP, ZF-NE или ZF3-KRAB по отдельности.

На фиг. 30D продемонстрировано, что обработка посредством ZF9-MQ1, ZF9-

MQ1+ZF3-KRAB или бицистронной ZF9-MQ1_ZF3-KRAB в концентрациях 0,5 мкг/мл, 1,0 мкг/мл и 2,0 мкг/мл оказывала минимальный эффект на жизнеспособность. первичных гепатоцитов, демонстрируя, что снижение экспрессии MYC менее значимо для нормальных клеток по сравнению с линиями клеток HCC.

На фиг. 31A продемонстрировано, что обработка посредством ZF9-MQ1+ZF3-KRAB демонстрировала статистически значимое уменьшение размера опухоли после трех введений, что приводило к уменьшению объема опухоли на 63% на день 25 по сравнению с контролем, и что обработка посредством ZF9-MQ1+ZF3-KRAB была связана с эффектом, оказываемым на объем опухоли, который эквивалентен обработке цисплатином.

На фиг. 31B продемонстрировано, что у мышей, которых обрабатывали посредством ZF9-MQ1+ZF3-KRAB, не наблюдали значительного снижения веса тела.

На фиг. 32A продемонстрировано, что обработка посредством ZF9-MQ1+ZF3-KRAB в дозе 1,5 мг/кг была связана со статистически значимым уменьшением размера опухоли после двух введений, что приводило к подавлению роста опухоли на 63% к дню 23 по сравнению с отрицательным контролем. ZF9-MQ1+ZF3-KRAB в дозе 3 мг/кг был связан со статистически значимым уменьшением размера опухоли после двух введений, что приводило к 54% подавлению опухолевого роста к дню 23 по сравнению с отрицательным контролем, а обработка в дозе 6 мг/кг посредством ZF9-MQ1+ZF3-KRAB связана со статистически значимым уменьшением размера опухоли после двух введений, что приводило к уменьшению объема опухоли на 63% на день 23 по сравнению с отрицательным контролем.

На фиг. 32B продемонстрировано, что у мышей, которых обрабатывали посредством ZF9-MQ1+ZF3-KRAB, не наблюдали значительного снижения веса тела. У мышей, которых обрабатывали сорафенибом, наблюдали первоначальное снижение веса тела с последующим увеличением общего веса тела, возможно, по причине увеличения массы опухоли.

На фиг. 33A продемонстрировано, что бицистронная конструкция ZF9-MQ1_ZF3-KRAB снижала уровень экспрессии mRNA MYC в концентрациях 0,6 мкг/мл и 2,0 мкг/мл в клетках Hep 3B в большей степени, чем отдельные конструкции (ZF3-KRAB или ZF9-MQ1) по отдельности. Бицистронная ZF9-MQ1_ ZF3-KRAB в концентрациях 0,6 мкг/мл и 2 мкг/мл снижала общий уровень mRNA MYC на 99% через 48 часов.

На фиг. 33B продемонстрировано, что бицистронная конструкция ZF9-MQ1_ZF3-KRAB снижала жизнеспособность клеток Hep 3B в большей степени, чем отдельные конструкции (ZF3-KRAB или ZF9-MQ1) по отдельности. Бицистронная ZF9-MQ1_ ZF3-KRAB в концентрациях 0,6 мкг/мл и 2 мкг/мл снижала жизнеспособность клеток Hep3B на приблизительно 80% и 27%, соответственно.

На фиг. 34A продемонстрировано, что бицистронная конструкция ZF9-MQ1_ZF3-KRAB снижала уровень mRNA MYC и жизнеспособность клеток Hep3B дозозависимым образом.

На фиг. 34B продемонстрировано, что бицистронная конструкция ZF9-MQ1_ZF3-KRAB снижала уровень mRNA MYC и жизнеспособность клеток HepG2 дозозависимым образом.

На фиг. 34C продемонстрировано, что бицистронная конструкция ZF9-MQ1_ZF3-KRAB снижала уровень mRNA MYC и жизнеспособность клеток SKHEP1 дозозависимым образом.

На фиг. 34D продемонстрирована бицистронная конструкция ZF9-MQ1_ZF3-KRAB, бицистронная конструкция ZF9-MQ1_ZF3-KRAB была эффективна против подтипов S1 и S2 HCC.

На фиг. 35 продемонстрировано, что через 48 часов после обработки бицистронной ZF9-MQ1_ZF3-KRAB >75% апоптозных клеток было обнаружено в линиях клеток Hep 3B и Hep G2 и приблизительно 15% апоптозных клеток было обнаружено в линии клеток SK-HEP-1. На клетки не влияла контрольная некодирующая mRNA по сравнению с необработанными клетками (5-20% фоновый апоптоз).

На фиг. 36 продемонстрировано, что в клетках SKHEP1 после 1 обработки бицистронной конструкцией ZF9-MQ1_ZF3-KRAB уровни mRNA MYC снижались в день один и оставались подавленными до пятнадцати дней после обработки.

На фиг. 37 продемонстрировано, что обработка бицистронной ZF9-MQ1_ZF3-KRAB снижала экспрессию mRNA и белка MYC через 6 часов, которая оставалась сниженной спустя 96 часов по сравнению с короткой некодирующей mRNA или необработанными клетками как в линии клеток Hep3B, так и в линии клеток SKHEP1.

На фиг. 38 продемонстрировано, как в момент времени 6 часов, так и момент времени 24 часа после трансфекции белки как OEC ZF3-KRAB, так и ZF9-MQ1, кодируемые бицистронной mRNA ZF9-MQ1_ZF3-KRAB, визуализировали с помощью HA-метки на результатах вестерн-блоттинга.

На фиг. 39A продемонстрировано, что IC50 сорафениба в SKHEP1 снижалась с 12,3 до 10,7 мкМ при введении сорафениба в комбинации с 0,6 мкг/мл бицистронной ZF9-MQ1_ZF3-KRAB. $IC_{50}$ сорафениба значительно не менялась в клетках SKHEP1 при введении сорафениба в комбинации с 0,1 мкг/мл бицистронной ZF9-MQ1_ZF3-KRAB.

На фиг. 39B продемонстрировано, что IC50 сорафениба в Hep 3B снижалась с 4,4 до 2,9 мкМ при введении сорафениба в комбинации с 0,6 мкг/мл бицистронной ZF9-MQ1_ZF3-KRAB. $IC_{50}$ сорафениба значительно не менялась в клетках Hep 3B при введении сорафениба в комбинации с 0,1 мкг/мл бицистронной ZF9-MQ1_ZF3-KRAB.

На фиг. 40A продемонстрировано, что $IC_{50}$ JQ1 в клетках SKHEP1 снижалась при обработке бицистронной ZF9-MQ1_ZF3-KRAB в концентрациях 0,6 мкг/мл и 0,1 мкг/мл, соответственно.

На фиг. 40B продемонстрировано, что $IC_{50}$ JQ1 в клетках Hep 3B снижалась при обработке бицистронной ZF9-MQ1_ZF3-KRAB в концентрациях 0,6 мкг/мл и 0,1 мкг/мл, соответственно.

На фиг. 41A продемонстрировано, что ZF17-MQ1 в концентрациях как 0,6, так и

1,2 мкг/мл был способен снижать уровень экспрессии mRNA MYC мыши в клетках Hepa1-6 по сравнению с необработанными клетками.

На фиг. 41B продемонстрировано, что ZF17-MQ1 в концентрациях как 0,6, так и 1,2 мкг/мл был способен снижать жизнеспособность клеток клеток Hepa1-6 мыши по сравнению с необработанными клетками.

На фиг. 42A продемонстрировано, что обработка посредством ZF17-MQ1 HCC-клеток Hepa1-6 мыши демонстрировала значительное снижение уровня белка MYC через 24 и 48 часов.

На фиг. 42B продемонстрировано, что обработка посредством ZF17-MQ1 HCC-клеток Hepa1-6 мыши демонстрировала значительное снижение уровня белка MYC через 24 и 48 часов.

На фиг. 42C продемонстрировано, что обработка посредством ZF17-MQ1 HCC-клеток Hepa1-6 мыши демонстрировала значительное снижение уровня mRNA MYC через 96 часов.

На фиг. 42D продемонстрировано, что обработка посредством ZF17-MQ1 HCC-клеток Hepa1-6 мыши демонстрировала значительную потерю жизнеспособности клеток через 96 часов.

На фиг. 43 продемонстрировано, что ZF17-MQ1 значительно снижал опухолевую нагрузку у животных после 4 доз и после двухнедельных лекарственных каникул, повторная обработка мышей посредством ZF17-MQ1 приводила к полному истощению опухоли через ~4 недели.

На фиг. 44A продемонстрировано, что клетки, обработанные посредством ZF17-MQ1, демонстрировали сниженные уровни белка MYC в клетках LL2 по сравнению с необработанными клетками или клетками, обработанными посредством GFP.

На фиг. 44B продемонстрировано по сравнению с уровнями, наблюдаемыми в необработанных клетках, что ZF17-MQ1 и ZF16-MQ1 в клетках LL2 снижали уровни mRNA MYC на >99,9% или 74%, соответственно.

На фиг. 44C продемонстрировано, что все три конструкции ZF15-MQ1, ZF16-MQ1 и ZF17-MQ1 были способны снижать жизнеспособность клеток в клетках LL2 в большей степени, чем в необработанных клетках и клетках, обработанных посредством GFP.

На фиг. 45A продемонстрировано, что ZF17-MQ1 снижал уровень mRNA MYC как в концентрации 1,25 мкг/мл, так и в концентрации 2,5 мкг/мл. По сравнению с уровнями, наблюдаемыми в необработанных клетках, при 2,5 мкг/мл ZF17-MQ1 снижал уровни mRNA MYC на 93% и 85% в клетках LL2 и CT26, соответственно.

На фиг. 45B продемонстрировано, что ZF17-MQ1 снижал жизнеспособности клеток в обеих концентрациях. По сравнению с необработанными клетками в этих условиях ZF17-MQ1 снижал жизнеспособность клеток на 87% и 93% в клетках LL2 и CT26, соответственно.

На фиг. 46 продемонстрировано, что ZF17-MQ1 снижал уровень mRNA MYC и снижает жизнеспособность клеток в клетках CMT167 и LL2 в большей степени, чем в

необработанных клетках и клетках, обработанных посредством GFP (отрицательный контроль). По сравнению с уровнями, наблюдаемыми в необработанных клетках, ZF17-MQ1 снижал уровни mRNA MYC на 62% и 73% в клетках CMT167 и LL2, соответственно. Более того, по сравнению с необработанными клетками в этих условиях ZF17-MQ1 снижал жизнеспособность клеток на 54% и 57% в клетках CMT167 и LL2, соответственно.

На фиг. 47 продемонстрировано, что ZF9-MQ1 снижал уровни mRNA MYC на 94%, 96%, 96% по сравнению с необработанными клетками в первичных эпителиальных клетках малых дыхательных путей, первичных долевых эпителиальных клетках и первичных фибробластах легких соответственно. Однако жизнеспособность снижалась только на 16%, 9% и 22% по сравнению с контрольными клетками.

На фиг. 48A продемонстрировано, что ZF9-MQ1 и JQ1, каждый по отдельности, подавляли жизнеспособность клеток A549.

На фиг. 48B продемонстрировано, что ZF9-MQ1 (0,5 мкг/мл) и JQ1 (концентрации до 6,25 мкМ) демонстрировали более чем аддитивный эффект на подавление жизнеспособности A549, чем это было спрогнозировано по их индивидуальной активности.

На фиг. 48C продемонстрировано, что ZF9-MQ1 (1,0 мкг/мл) и JQ1 (концентрации до 6,25 мкМ) демонстрировали более чем аддитивный эффект на подавление жизнеспособности A549, чем это было спрогнозировано по их индивидуальной активности.

На фиг. 49A продемонстрировано, что ZF9-MQ1 и BET762, каждый по отдельности, подавляли жизнеспособность клеток A549.

На фиг. 49B продемонстрировано, что ZF9-MQ1 (0,5 мкг/мл) и BET762 (концентрации до 1,25 мкМ) демонстрировали более чем аддитивный эффект на подавление жизнеспособности A549, чем это было спрогнозировано по их индивидуальной активности.

На фиг. 49C продемонстрировано, что ZF9-MQ1 (1,0 мкг/мл) и BET762 (концентрации до 0,625 мкМ) демонстрировали более чем аддитивный эффект на подавление жизнеспособности A549, чем это было спрогнозировано по их индивидуальной активности.

На фиг. 50A продемонстрировано, что ZF9-MQ1 и бирабресиб, каждый по отдельности, подавляли жизнеспособность клеток A549.

На фиг. 50B продемонстрировано, что ZF9-MQ1 (0,5 мкг/мл) и бирабресиб (концентрации до 0,625 мкМ) демонстрировали более чем аддитивный эффект на подавление жизнеспособности A549, чем это было спрогнозировано по их индивидуальной активности.

На фиг. 50C продемонстрировано, что ZF9-MQ1 (1,0 мкг/мл) и бирабресиб (концентрации до 0,313 мкМ) демонстрировали более чем аддитивный эффект на подавление жизнеспособности A549, чем это было спрогнозировано по их индивидуальной активности.

На фиг. 51A продемонстрировано, что ZF9-MQ1 и траметиниб, каждый по отдельности, подавляли жизнеспособность клеток A549.

На фиг. 51B продемонстрировано, что ZF9-MQ1 (0,5 мкг/мл) и траметиниб (концентрации до 0,05 мкМ) демонстрировали более чем аддитивный эффект на подавление жизнеспособности A549, чем это было спрогнозировано по их индивидуальной активности.

На фиг. 51C продемонстрировано, что ZF9-MQ1 (1,0 мкг/мл) и траметиниб (концентрации до 0,05 мкМ) демонстрировали более чем аддитивный эффект на подавление жизнеспособности A549, чем это было спрогнозировано по их индивидуальной активности.

На фиг. 52A продемонстрировано, что все конструкции ZF9-MQ1, ZF54-KRAB, ZF67-KRAB и ZF68-KRAB были способны снижать уровни mRNA MYC в клетках H2009 по меньшей мере на 42% через 72 часа после обработки по сравнению с необработанными клетками.

На фиг. 52B продемонстрировано, что все конструкции ZF9-MQ1, ZF67-KRAB и ZF68-KRAB были способны снижать уровни mRNA MYC в клетках H226 на по меньшей мере 27% через 72 часа после обработки по сравнению с необработанными клетками.

На фиг. 52C продемонстрировано, что обе конструкции ZF9-MQ1 и ZF54-KRAB были способны снижать уровни mRNA MYC в клетках H226 на по меньшей мере 27% через 72 часа после обработки по сравнению с необработанными клетками.

На фиг. 52D продемонстрировано, что все конструкции ZF9-MQ1, ZF61-KRAB, ZF67-KRAB и ZF68-KRAB были способны снижать уровни mRNA MYC в клетках H460 на по меньшей мере 26% через 72 часа после обработки по сравнению с необработанными клетками.

На фиг. 53 продемонстрировано, что в наиболее высокой протестированной концентрации ZF9-MQ1 и ZF54-KRAB, каждый по отдельности, снижали уровень mRNA MYC в клетках H2009 на 99% или 62%, соответственно, по сравнению с необработанными контрольными клетками. При объединении в комбинацию менее 0,313 мкг/мл ZF9-MQ1 с 1 или 2 мкг/мл ZF54-KRAB уровень mRNA MYC снижался в большей степени, чем это наблюдали при любой обработке по отдельности.

На фиг. 54 продемонстрировано, что ZF9-MQ1 снижал уровень mRNA MYC в клетках H1299 на 95% по сравнению с необработанными контрольными клетками через 48 часов и сохраняла снижение уровня на 90% от контрольных уровней через 144 часа. Комбинация ZF9-MQ1 плюс ZF54-KRAB снижала уровни mRNA MYC до величины 98% через 48 часов и сохраняла снижение уровня до величины 93% относительно контрольных уровней через 144 часа (фиг. 54). Более того, из данных видно, что ZF9-MQ1 и ZF9-MQ1 в комбинации с ZF54-KRAB снижали уровни mRNA MYC в клетках H1299 на по меньшей мере 6 дней.

На фиг. 55 продемонстрировано, что через 24 часа после введения в клетки H2009 ZF9-MQ1 и ZF54-KRAB снижали уровни mRNA MYC на величину до 83% и 55%,

соответственно, по сравнению с необработанными клетками. Уровни mRNA MYC дополнительно снижались еще на 13% в клетках, обработанных посредством ZF9-MQ1, до величины 96% относительно необработанных контролей через 48 часов после обработки, тогда как ZF54-KRAB дополнительно не снижает уровни MYC. Уровни mRNA MYC в клетках, обработанных посредством ZF9-MQ1_ZF54-KRAB и ZF54-KRAB_ZF9-MQ1, снижались до величины 95% и 96% относительно контрольных клеток, соответственно, через 24 часа после обработки. Данные свидетельствовали, что данные регуляторы были способны снижать уровни mRNA MYC раньше, чем ZF9-MQ1, что приводило к более высокой степени снижения уровня активности MYC в обработанных клетках по сравнению с обработанными посредством ZF9-MQ1 клетками через 24 часа в клетках H2009.

На фиг. 56 продемонстрировано, что обработка посредством ZF9-MQ1 подавляла рост опухоли в модели подкожной опухоли H460 на аналогичном или более высоком уровне по сравнению с подавлением роста опухоли, индуцированным сорафенибом.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ОПРЕДЕЛЕННЫХ ВАРИАНТОВ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ

Настоящее изобретение предусматривает технологии для модулирования, например снижения, уровня экспрессии гена-мишени, например MYC, в клетке, например у субъекта или пациента, посредством применения репрессора экспрессии или системы, описанных в данном документе.

Многие различные заболевания и синдромы, в том числе рак, аутоиммунитет, сердечно-сосудистые заболевания и ожирение, могут быть вызваны неправильной регуляцией экспрессии генов. В частности, давно известно, что сверхэкспрессия факторов транскрипции способствует онкогенезу, а недавние исследования свидетельствуют, что сверхэкспрессия онкогенных факторов транскрипции может изменять основную ауторегуляторную схему клетки.

MYC, фактор транскрипции и главный клеточный регулятор, зачастую характеризуется нарушенной функцией в более чем 50% случаев рака человека и играет центральную роль почти во всех аспектах онкогенного процесса. За исключением генов раннего ответа MYC обычно повышает уровень экспрессии генов. MYC является наиболее часто амплифицируемым онкогеном, а повышенная экспрессия его генного продукта связана с агрессивностью опухоли и плохим клиническим исходом. Повышенные уровни c-MYC могут способствовать онкогенезу в широком диапазоне тканей. Рост и пролиферация большинства опухолевых клеток зависят от фактора транскрипции c-MYC. Сверхэкспрессия MYC также связана с хроническим заболеванием печени, например вирусным и связанным с алкоголем заболеванием печени. Уровень сверхэкспрессии MYC варьирует в зависимости от конкретных подтипов рака. Без ограничения какой-либо теорией, считается, что модулирование, например снижение, уровней MYC у субъекта (например, в целом или в конкретной ткани-мишени или тканях-мишенях), страдающего нарушением неправильной регуляции MYC, может уменьшить

или устранить симптомы нарушения неправильной регуляции MYC.

Настоящее изобретение отчасти предусматривает репрессор экспрессии, содержащий нацеливающуюся функциональную группу, которая связывается с промотором гена-мишени, например промотором MYC или функционально связанным с геном-мишенью, например геном MYC, и эффекторную функциональную группу, способную модулировать (например, снижать) уровень экспрессии гена-мишени, например MYC, при локализации с помощью нацеливающейся функциональной группы. В некоторых вариантах осуществления репрессоры экспрессии, раскрытые в данном документе, специфически связываются с элементом контроля экспрессии (например, промотором или энхансером, репрессором или сайленсером), функционально связанным с геном-мишенью, например MYC, посредством нацеливающейся функциональной группы, а эффекторная функциональная группа модулирует уровень экспрессии гена-мишени, например MYC. В некоторых вариантах осуществления репрессоры экспрессии, раскрытые в данном документе, специфически связываются с якорной последовательностью объединения, опосредованного якорной последовательностью (ASMC), содержащего ген-мишень, например MYC, или с последовательностью, расположенной проксимально по отношению к якорной последовательности, посредством нацеливающейся функциональной группы, а эффекторная функциональная группа модулирует уровень экспрессии гена-мишени, например MYC. В некоторых вариантах осуществления репрессоры экспрессии, раскрытые в данном документе, специфически связываются с геномным локусом, локализованным в области суперэнхансера гена-мишени, например MYC, а эффекторная функциональная группа модулирует уровень экспрессии гена-мишени, например MYC.

Дополнительно настоящее изобретение отчасти предусматривает систему репрессии экспрессии, содержащую два или более репрессоров экспрессии, каждый из которых содержит нацеливающуюся функциональную группу и необязательно эффекторную функциональную группу. В некоторых вариантах осуществления нацеливающиеся функциональные группы целенаправленно воздействуют на две или более отличающихся последовательностей ДНК (например, каждый репрессор экспрессии может целенаправленно воздействовать на отличающуюся последовательность). В некоторых вариантах осуществления первый репрессор экспрессии связывается с регуляторным элементом транскрипции (например, промотором или сайтом начала транскрипции (TSS)), функционально связанным с геном-мишенью, например MYC, а второй репрессор экспрессии связывается с якорной последовательностью объединения, опосредованного якорной последовательностью (ASMC), содержащего ген-мишень, например MYC. В некоторых вариантах осуществления первый репрессор экспрессии связывается с регуляторным элементом транскрипции (например, промотором или сайтом начала транскрипции (TSS)), функционально связанным с геном-мишенью, например MYC, а второй репрессор экспрессии связывается с элементом контроля экспрессии (например, энхансером, суперэнхансером, репрессором или сайленсером), функционально

связанным с геном-мишенью, например MYC. В некоторых вариантах осуществления первый репрессор экспрессии связывается с якорной последовательностью объединения, опосредованного якорной последовательностью (ASMC), содержащего ген-мишень, например MYC, а второй репрессор экспрессии связывается с элементом контроля экспрессии (например, энхансером, суперэнхансером, репрессором или сайленсером), функционально связанным с геном-мишенью. Обычно модуляция уровня экспрессии гена-мишени, например MYC, с помощью системы репрессии экспрессии предусматривает связывание первого репрессора экспрессии и второго репрессора экспрессии с соответственно первой и второй последовательностями ДНК. Связывание первой и второй последовательностей ДНК локализует функциональные свойства первой и второй эффекторной функциональной группы в этих сайтах. Без ограничения какой-либо теорией, в некоторых вариантах осуществления использование функциональных свойств как первой, так и второй функциональной группы репрессора стабильно репрессирует экспрессию гена-мишени, ассоциированного с первой и/или второй последовательностями ДНК или содержащего их, например, где первая и/или вторая последовательности ДНК представляют собой или содержат последовательности гена-мишени или одного или нескольких функционально связанных элементов контроля транскрипции. В некоторых вариантах осуществления система репрессоров экспрессии кодируется бицистронной последовательностью нуклеиновой кислоты.

Настоящее изобретение дополнительно предусматривает нуклеиновые кислоты, кодирующие указанные репрессоры экспрессии и/или системы репрессоров экспрессии, композиции, содержащие репрессоры экспрессии и/или системы репрессоров экспрессии, и способы доставки указанных нуклеиновых кислот. Дополнительно предусмотрены способы повышения уровня экспрессии гена-мишени, например экспрессии гена MYC, в клетке с применением репрессоров экспрессии или систем репрессоров экспрессии, описанных в данном документе.

Репрессоры экспрессии

Как описано в данном документе, настоящее изобретение отчасти предусматривает репрессоры экспрессии для модулирования, например снижения, уровня экспрессии гена-мишени, например MYC. В некоторых вариантах осуществления репрессор экспрессии может содержать нацеливающуюся функциональную группу, которая связывается с промотором гена-мишени, например промотором MYC, и необязательно эффекторную функциональную группу. В некоторых вариантах осуществления нацеливающаяся функциональная группа специфически связывается с последовательностью ДНК-мишенью, например последовательностью ДНК MYC, тем самым локализуя функциональное свойство репрессора экспрессии на последовательности ДНК. В некоторых вариантах осуществления репрессор экспрессии содержит нацеливающуюся функциональную группа и одну эффекторную функциональную группу. В некоторых вариантах осуществления репрессор экспрессии содержит нацеливающуюся функциональную группу и множество эффекторных функциональных групп (например, 1,

2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или более эффекторных доменов (и необязательно менее 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5 , 4, 3 или 2 эффекторных доменов)).

Репрессор экспрессии может содержать множество эффекторных функциональных групп, где каждая эффекторная функциональная группа характеризуется отличающимся функциональным свойством по сравнению с другими эффекторными функциональными группами. Например, репрессор экспрессии может содержать две эффекторные функциональные группы, где первая эффекторная функциональная группа характеризуется функциональным свойством ДНК-метилазы, а вторая эффекторная функциональная группа характеризуется функциональным свойством репрессора транскрипции. В некоторых вариантах осуществления репрессор экспрессии содержит эффекторные функциональные группы, функциональные свойства которых дополняют друг другу в отношении снижения уровня экспрессии гена-мишени, например MYC, где функциональные свойства совместно обеспечивают подавление экспрессии и необязательно не подавляют или незначительно подавляют экспрессию, когда присутствуют по отдельности. В некоторых вариантах осуществления репрессор экспрессии содержит множество эффекторных функциональных групп, где каждая эффекторная функциональная группа дополняет каждую другую эффекторную функциональную группу, каждая эффекторная функциональная группа снижает уровень экспрессии гена-мишени, например MYC.

В некоторых вариантах осуществления репрессор экспрессии содержит комбинацию эффекторных функциональных групп, функциональные свойства которых действуют синергически друг с другом в отношении снижения уровня экспрессии гена-мишени, например MYC. Без ограничения какой-либо теорией, в некоторых вариантах осуществления эпигенетические модификации геномного локуса являются кумулятивными в том смысле, что множественные эпигенетические маркеры, активирующие транскрипцию (например, несколько отличающихся типов эпигенетических маркеров и/или более обширная маркировка данного типа) по отдельности, совместно подавляют экспрессию более эффективно, чем только отдельные модификации (например, вызывая большее снижение уровня экспрессии и/или более продолжительное снижение уровня экспрессии). В некоторых вариантах осуществления репрессор экспрессии содержит множество эффекторных функциональных групп, где каждая эффекторная функциональная группа действует синергически с каждой другой эффекторной функциональной группой, например, каждая эффекторная функциональная группа снижает уровень экспрессии гена-мишени, например MYC. В некоторых вариантах осуществления репрессор экспрессии (содержащий множество эффекторных функциональных групп, которые действуют синергически друг с другом) более эффективно подавляет экспрессию гена-мишени, например MYC, чем репрессор экспрессии, содержащий отдельную эффекторную функциональную группу. В некоторых вариантах осуществления репрессор экспрессии, содержащий указанное множество

эффекторных функциональных групп, в по меньшей мере 1,05x (т. е. в 1,05 раза), 1,1x, 1,15x, 1,2x, 1,25x, 1,3x, 1,35x, 1,4x, 1,45x, 1,5x, 1,55x, 1,6x, 1,65x, 1,7x, 1,75x, 1,8x, 1,85x, 1,9x, 1,95x, 2x, 3x, 4x, 5x, 6x, 7x, 8x, 9x, 10x, 20x, 30x, 40x, 50x, 60x, 70x, 80x, 90x, или 100x эффективнее снижает уровень экспрессии гена-мишени, например MYC, чем репрессор экспрессии, содержащий отдельную эффекторную функциональную группу.

В некоторых вариантах осуществления репрессор экспрессии содержит одну или несколько нацеливающихся функциональных групп, например: домен Cas, эффекторный домен TAL или домен по типу Zn-пальца. В одном варианте осуществления, когда система репрессоров экспрессии содержит две или более нацеливающихся функциональных групп одного типа, например два или более домена Cas, нацеливающиеся функциональные группы специфически связываются с двумя или более отличающимися последовательностями. Например, в системе репрессоров экспрессии, содержащей два или более доменов Cas, два или более доменов Cas могут быть выбраны или изменены таким образом, что они в значительной степени связывают только gRNA, соответствующую их последовательности-мишени (например, и в значительной степени не связывают gRNA, соответствующую мишени для другого домена Cas).

В некоторых вариантах осуществления репрессор экспрессии содержит нацеливающуюся функциональную группу и эффекторную функциональную группу, которые связаны ковалентно, например пептидной связью. В некоторых вариантах осуществления нацеливающаяся функциональная группа и эффекторная функциональная группа расположены в одной и той же полипептидной цепи, например соединены одной или несколькими пептидными связями и/или линкером. В некоторых вариантах осуществления репрессор экспрессии представляет собой или предусматривает слитую молекулу, например, содержащую нацеливающуюся функциональную группу и эффекторную функциональную группу, связанные пептидной связью и/или линкером. В некоторых вариантах осуществления репрессор экспрессии содержит нацеливающуюся функциональную группу, которая расположена на N-концевой части эффекторной функциональной группы в той же полипептидной цепи. В некоторых вариантах осуществления репрессор экспрессии содержит нацеливающуюся функциональную группу, которая расположена на C-концевой части эффекторной функциональной группы в той же полипептидной цепи. В некоторых вариантах осуществления репрессор экспрессии содержит нацеливающуюся функциональную группу и эффекторную функциональную группу, которые ковалентно связаны непептидной связью. В некоторых вариантах осуществления нацеливающаяся функциональная группа конъюгирована с эффекторной функциональной группой непептидной связью. В некоторых вариантах осуществления репрессор экспрессии содержит нацеливающуюся функциональную группу и множество эффекторных функциональных групп, где нацеливающаяся функциональная группа и множество эффекторных функциональных групп являются ковалентно связанными, например пептидными связями (например, нацеливающаяся функциональная группа и множество эффекторных функциональных групп все соединены

серией ковалентных связей, хотя каждая отдельная функциональная группа может не иметь ковалентной связи с каждой другой эффекторной функциональной группой).

В других вариантах осуществления репрессор экспрессии содержит нацеливающуюся функциональную группу и эффекторную функциональную группу, которые являются нековалентно связанными, например которые являются нековалентно ассоциированными друг с другом. В некоторых вариантах осуществления репрессор экспрессии содержит нацеливающуюся функциональную группу, которая нековалентно связывается с эффекторной функциональной группой, или наоборот. В некоторых вариантах осуществления репрессор экспрессии содержит нацеливающуюся функциональную группу и множество эффекторных функциональных групп, где нацеливающаяся функциональная группа и по меньшей мере одна эффекторная функциональная группа не являются ковалентно связанными, например, являются нековалентно ассоциированными друг с другом, и где нацеливающаяся функциональная группа и по меньшей мере одна эффекторная функциональная группа являются ковалентно связанными, например пептидной связью.

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

В некоторых вариантах осуществления репрессор экспрессии содержит эффекторную функциональную группу, где эффекторная функциональная группа предусматривает белок, выбранный из MQ1, DNMT1, DNMT3A1, DNMT3A2, DNMT3B1, DNMT3B2, DNMT3B3, DNMT3B4, DNMT3B5, DNMT3B6, DNMT3L, HDAC1, HDAC2, HDAC3, HDAC4, HDAC5, HDAC6, HDAC7, HDAC8, HDAC9, HDAC10, HDAC11, SIRT1, SIRT2, SIRT3, SIRT4, SIRT5, SIRT6, SIRT7, SIRT8, SIRT9, KDM1A (т. е. LSD1), KDM1B

(т. е. LSD2), KDM2A, KDM2B, KDM5A, KDM5B, KDM5C, KDM5D, KDM4B, NO66, SETDB1, SETDB2, EHMT2 (т. е. G9A), EHMT1 (т. е. GLP), SUV39H1, EZH2, EZH1, SUV39H2, SETD8, SUV420H1, SUV420H2, KRAB (например, домена KRAB), MeCP2, HP1, RBBP4, REST, FOG1, SUZ12 или их функционального варианта или фрагмента.

В некоторых вариантах осуществления репрессор экспрессии содержит первую эффекторную функциональную группу и вторую эффекторную функциональную группу, где первая эффекторная функциональная группа предусматривает белок, выбранный из MQ1, DNMT1, DNMT3A1, DNMT3A2, DNMT3B1, DNMT3B2, DNMT3B3, DNMT3B4, DNMT3B5, DNMT3B6, DNMT3L, HDAC1, HDAC2, HDAC3, HDAC4, HDAC5, HDAC6, HDAC7, HDAC8, HDAC9, HDAC10, HDAC11, SIRT1, SIRT2, SIRT3, SIRT4, SIRT5, SIRT6, SIRT7, SIRT8, SIRT9, KDM1A (т. е., LSD1), KDM1B (т. е., LSD2), KDM2A, KDM2B, KDM5A, KDM5B, KDM5C, KDM5D, KDM4B, NO66, SETDB1, SETDB2, EHMT2 (т. е. G9A), EHMT1 (т. е. GLP), SUV39H1, EZH2, EZH1, SUV39H2, SETD8, SUV420H1, SUV420H2, KRAB (например, домена KRAB), MeCP2, HP1, RBBP4, REST, FOG1, SUZ12 или их функционального варианта или фрагмента, а вторая эффекторная функциональную группу содержит отличающийся белок, выбранный из MQ1, DNMT1, DNMT3A1, DNMT3A2, DNMT3B1, DNMT3B2, DNMT3B3, DNMT3B4, DNMT3B5, DNMT3B6, DNMT3L, HDAC1, HDAC2, HDAC3, HDAC4, HDAC5, HDAC6, HDAC7, HDAC8, HDAC9, HDAC10, HDAC11, SIRT1, SIRT2, SIRT3, SIRT4, SIRT5, SIRT6, SIRT7, SIRT8, SIRT9, KDM1A (т. е. LSD1), KDM1B (т. е. LSD2), KDM2A, KDM2B, KDM5A, KDM5B, KDM5C, KDM5D, KDM4B, NO66, SETDB1, SETDB2, EHMT2 (т. е. G9A), EHMT1 (т. е. GLP), SUV39H1, EZH2, EZH1, SUV39H2, SETD8, SUV420H1, SUV420H2, KRAB (например, домена KRAB), MeCP2, HP1, RBBP4, REST, FOG1, SUZ12 или их функционального варианта или фрагмента.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение предусматривает последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие репрессор экспрессии, систему репрессоров экспрессии, нацеливающуюся функциональную группу и/или эффекторную функциональную группу, которые описаны в данном документе. Квалифицированному специалисту известно, что последовательности нуклеиновых кислот РНК являются идентичными соответствующим последовательностям ДНК, за исключением того, что обычно тимин (T) заменен урацилом (U). Следует понимать, что когда нуклеотидная последовательность представлена последовательностью ДНК (например, содержащей A, T, G, C), тогда настоящее изобретение также предусматривает соответствующую последовательность РНК (например, содержащую A, U, G, C) в которой "U" заменяет "T". Для описания полинуклеотидных последовательностей в данном документе используются общепринятые обозначения: левый конец однонитевой полинуклеотидной последовательности является 5'-концом; левостороннее направление двухнитевой полинуклеотидной последовательности называется 5'-направлением.

Специалистам в данной области будет понятно, что вследствие вырожденности генетического кода может быть получено множество нуклеотидных последовательностей,

кодирующих репрессор экспрессии, содержащий нацеливающуюся функциональную группу и/или эффекторную функциональную группу, которые описаны в данном документе, некоторые из которых характеризуется сходством, например 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью, с последовательностями нуклеиновой кислоты, раскрытыми в данном документе. Например, все из кодонов AGA, AGG, CGA, CGC, CGG и CGU кодируют аминокислоту аргинин. Таким образом, в каждом положении в молекулах нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, где аргинин определяется кодоном, этот кодон может быть изменен на любой из описанных выше соответствующих кодонов без изменения кодируемого полипептида.

В некоторых вариантах осуществления сцепление нуклеиновых кислот, кодирующих репрессор экспрессии, содержащий нацеливающуюся функциональную группу и/или эффекторную функциональную группу, может представлять собой часть или всю кодон-оптимизированную кодирующую область, оптимизированную в соответствии с частотой использования кодонов у млекопитающих, например человека. В некоторых вариантах осуществления сцепление нуклеиновых кислот, кодирующих нацеливающуюся функциональную группу и/или эффекторную функциональную группу, является кодон-оптимизированным для повышения уровня экспрессии белка и/или увеличения продолжительности экспрессии белка. В некоторых вариантах осуществления уровень белка, продуцируемого кодон-оптимизированной последовательностью нуклеиновой кислоты, на по меньшей мере 1%, по меньшей мере 2%, по меньшей мере 5%, по меньшей мере 10%, по меньшей мере 15%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40% или по меньшей мере 50% выше по сравнению с уровнями белка при кодировании последовательностью нуклеиновой кислоты, которая не является кодон-оптимизированной.

Системы репрессии экспрессии

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

связывается, со вторым репрессором экспрессии.

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

В некоторых вариантах осуществления каждый из репрессоров экспрессии системы репрессоров экспрессии содержит отличающуюся нацеливающуюся функциональную группу (например, каждый из первого, второго, третьего или дополнительных репрессоров экспрессии содержит отличающиеся друг от друга нацеливающиеся функциональные группы). Например, система репрессии экспрессии может содержать первый репрессор экспрессии и второй репрессор экспрессии, где первый репрессор экспрессии содержит первую нацеливающуюся функциональную группу (например, домен Cas9, эффекторный домен TAL или домен по типу "Zn-пальца"), а второй репрессор экспрессии содержит вторую нацеливающуюся функциональную группу (например, домен Cas9, эффекторный домен TAL или домен по типу "Zn-пальца"), отличающуюся от первой нацеливающейся функциональной группы. В некоторых вариантах осуществления "отличающийся" может означать содержащий различные типы нацеливающихся функциональных групп, например первая нацеливающаяся функциональная группа предусматривает домен Cas9, а вторая функциональная группа, нацеливающаяся на ДНК, предусматривает домен по типу "Zn-пальца". В других вариантах осуществления "отличающийся" может означать содержащий различные варианты одного и того же типа нацеливающейся функциональной группы, например первая нацеливающаяся функциональная группа предусматривает первый домен Cas9 (например, из первого вида), и вторая нацеливающаяся функциональная группа предусматривает второй домен Cas9 (например, из второго вида). В одном варианте осуществления, когда система репрессоров экспрессии содержит две или более нацеливающихся функциональных групп одного типа, например два или более доменов Cas9 или ZF, нацеливающиеся функциональные группы специфически связываются с

двумя или более отличающимися последовательностями. Например, в системе репрессоров экспрессии, содержащей два или более доменов Cas9, два или более доменов Cas9 могут быть выбраны или изменены таким образом, что они в значительной степени связывают только gRNA, соответствующую их последовательности-мишени (например, и в значительной степени не связывают gRNA, соответствующую мишени для другого домена Cas9). В дополнительном примере в системе репрессоров экспрессии, содержащей две или более эффекторных функциональных групп, две или более эффекторных функциональных групп могут быть выбраны или изменены таким образом, что они в значительной степени связывают только свою последовательность-мишень (например, и в значительной степени не связывают последовательность-мишень для другой эффекторной функциональной группы).

В некоторых вариантах осуществления система репрессоров экспрессии содержит три или более репрессоров экспрессии, и при этом два или более репрессоров экспрессии содержат одну и ту же нацеливающуюся функциональную группу. Например, система репрессоров экспрессии может содержать три репрессора экспрессии, где оба из первого и второго репрессоров экспрессии содержат первую нацеливающуюся функциональную группу, а третий репрессор экспрессии содержит вторую отличающуюся нацеливающуюся функциональную группу. В качестве дополнительного примера система репрессоров экспрессии может содержать четыре репрессора экспрессии, где оба из первого и второго репрессоров экспрессии содержат первую нацеливающуюся функциональную группу, а третий и четвертый репрессоры экспрессии содержат вторую отличающуюся нацеливающуюся функциональную группу. В качестве дополнительного примера система репрессоров экспрессии может содержать пять репрессоров экспрессии, где оба из первого и второго репрессоров экспрессии содержат первую нацеливающуюся функциональную группу, оба из третьего и четвертого репрессоров экспрессии содержат вторую отличающуюся нацеливающуюся функциональную группу, а пятый репрессор экспрессии содержит третью отличающуюся нацеливающуюся функциональную группу. Как описано выше, "отличающиеся" может означать, что они содержат различные типы нацеливающихся функциональных групп или содержат отличающиеся варианты одного и того же типа нацеливающейся функциональной группы.

В некоторых вариантах осуществления каждый из репрессоров экспрессии системы репрессоров экспрессии связывается с отличающейся последовательностью ДНК (например, каждый из первого, второго, третьего или последующих репрессоров экспрессии связывают последовательности ДНК, которые отличаются друг от друга). Например, система репрессии экспрессии может содержать первый репрессор экспрессии и второй репрессор экспрессии, где первый репрессор экспрессии связывается с первой последовательностью ДНК, и второй репрессор экспрессии связывается со второй последовательностью ДНК. В некоторых вариантах осуществления отличающаяся может означать то, что существует по меньшей мере одно положение, которое является неидентичным между последовательностью ДНК, связанной одним репрессором

экспрессии, и последовательностью ДНК, связанной другим репрессором экспрессии, или что присутствует по меньшей мере одно положение в последовательности ДНК, связанной одним репрессором экспрессии, которое не присутствует в последовательности ДНК, связанной другим репрессором экспрессии.

В некоторых вариантах осуществления первая последовательность ДНК может быть расположена в первой нити геномной ДНК, и вторая последовательность ДНК может быть расположена во второй нити геномной ДНК. В некоторых вариантах осуществления первая последовательность ДНК может быть расположена в той же цепи геномной ДНК, что и вторая последовательность ДНК.

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

В некоторых вариантах осуществления система репрессии экспрессии содержит два или более (например, два) репрессоров экспрессии, и множество (например, два) репрессоров экспрессии содержат нацеливающиеся функциональные группы, которые связываются с отличающимися последовательностями ДНК. В таких вариантах осуществления первая нацеливающаяся функциональная группа может связываться с первой последовательностью ДНК, а вторая функциональная группа, нацеливающаяся на ДНК, может связываться со второй последовательностью ДНК, где первая и вторая последовательности ДНК являются отличающимися и не перекрываются. В некоторых таких вариантах осуществления первая последовательность ДНК отделена от второй последовательности ДНК по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16,

17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, или 100 парами оснований (и необязательно не более чем 500, 400, 300, 200, 100, 95, 90, 85, 80, 75, 70, 65, 60, 55 или 50 парами оснований). В некоторых таких вариантах осуществления первая последовательность ДНК отделена от второй последовательности ДНК не более чем 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, или 100 парами оснований (и необязательно никакими парами оснований, например первая и вторая последовательности непосредственно прилегают друг к другу).

В некоторых вариантах осуществления каждый из репрессоров экспрессии системы репрессоров экспрессии содержит отличающуюся эффекторную функциональную группу (например, каждый из первого, второго, третьего или дополнительных репрессоров экспрессии содержит отличающиеся друг от друга эффекторные функциональные группы). Например, система репрессии экспрессии может содержать первый репрессор экспрессии и второй репрессор экспрессии, где первый репрессор экспрессии содержит первую эффекторную функциональную группу (например, содержащую ДНК-метилтрансферазу или ее функциональный фрагмент), а второй репрессор экспрессии содержит вторую эффекторную функциональную группу (например, содержащую репрессор транскрипции (например, KRAB) или его функциональный фрагмент), отличающуюся от первой эффекторной функциональной группы. В некоторых вариантах осуществления термин "отличающийся" может означать наличие различных типов эффекторной функциональной группы. В других вариантах осуществления "отличающийся" может означать, что они содержат различные варианты одного и того же типа эффекторной функциональной группы, например первая эффекторная функциональная группа предусматривает первую ДНК-метилтрансферазу (например, имеющую первый сайт специфичности или первую аминокислотную последовательность), а вторая эффекторная функциональная группа предусматривает вторую ДНК-метилтрансферазу (например, имеющую второй сайт специфичности или вторую аминокислотную последовательность).

В некоторых вариантах осуществления система репрессоров экспрессии содержит первый репрессор экспрессии, содержащий первую эффекторную функциональную группу, и второй репрессор экспрессии, содержащий вторую эффекторную функциональную группу, где первая эффекторная функциональная группа предусматривает белок, выбранный из MQ1, DNMT1, DNMT3A1, DNMT3A2, DNMT3B1, DNMT3B2, DNMT3B3, DNMT3B4, DNMT3B5, DNMT3B6, DNMT3L, HDAC1, HDAC2, HDAC3, HDAC4, HDAC5, HDAC6, HDAC7, HDAC8, HDAC9, HDAC10, HDAC11, SIRT1, SIRT2, SIRT3, SIRT4, SIRT5, SIRT6, SIRT7, SIRT8, SIRT9, KDM1A (т. е. LSD1), KDM1B (т. е. LSD2), KDM2A, KDM2B, KDM5A, KDM5B, KDM5C, KDM5D, KDM4B, NO66, SETDB1, SETDB2, EHMT2 (т. е. G9A), EHMT1 (т. е. GLP), SUV39H1, EZH2, EZH1, SUV39H2, SETD8, SUV420H1, SUV420H2, KRAB, MeCP2, HP1, RBBP4, REST, FOG1, SUZ12 или их функционального варианта или фрагмента, и вторая эффекторная

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

В некоторых вариантах осуществления первая или вторая эффекторная функциональная группа характеризуется активностью ДНК-метилтрансферазы (например, MQ1, DNMT1, DNMT3A1, DNMT3A2, DNMT3B1, DNMT3B2, DNMT3B3, DNMT3B4, DNMT3B5, DNMT3B6, DNMT3L или функционального варианта или фрагмента любого из них), а другая эффекторная функциональная группа характеризуется активностью репрессора транскрипции (например, KRAB, MeCP2, HP1, RBBP4, REST, FOG1, SUZ12 или функционального варианта или фрагмента любого из них), первая или вторая эффекторная функциональная группа характеризуется активностью гистонметилтрансферазы, и другая эффекторная функциональная группа характеризуется активностью гистондеацетилазы (например, HDAC1, HDAC2, HDAC3, HDAC4, HDAC5, HDAC6, HDAC7, HDAC8, HDAC9, HDAC10, HDAC11, SIRT1, SIRT2, SIRT3, SIRT4, SIRT5, SIRT6, SIRT7, SIRT8, SIRT9 или функционального варианта или фрагмента любого из них). В некоторых вариантах осуществления первая или вторая эффекторная функциональная группа характеризуется активностью гистонметилтрансферазы, и другая эффекторная функциональная группа характеризующаяся активностью ДНК-метилтрансферазы (например, MQ1, DNMT1, DNMT3A1, DNMT3A2, DNMT3B1, DNMT3B2, DNMT3B3, DNMT3B4, DNMT3B5, DNMT3B6, DNMT3L или функционального варианта или фрагмента любого из них). В некоторых вариантах осуществления первая или вторая эффекторная функциональная группа характеризуется активностью ДНК-метилтрансферазы, и другая эффекторная функциональная группа характеризуется активностью репрессора транскрипции. В некоторых вариантах осуществления первая или вторая эффекторная функциональная группа характеризуется активностью гистонметилтрансферазы, и другая эффекторная функциональная группа характеризуется активностью репрессора транскрипции (например, KRAB, MeCP2, HP1, RBBP4, REST, FOG1, SUZ12 или функционального варианта или фрагмента любого из них). В некоторых вариантах осуществления первая или вторая эффекторная функциональная группа характеризуется активностью репрессора транскрипции, и другая эффекторная функциональная группа характеризуется активностью отличающегося репрессора транскрипции. В некоторых вариантах осуществления первая или вторая эффекторная функциональная группа характеризуется активностью ДНК-метилтрансферазы, и другая эффекторная функциональная группа характеризуется

активностью такой же ДНК-метилтрансферазы. В некоторых вариантах осуществления первая или вторая эффекторная функциональная группа характеризуется активностью ДНК-метилтрансферазы, и другая эффекторная функциональная группа характеризуется активностью гистондеацетилазы. В некоторых вариантах осуществления первая или вторая эффекторная функциональная группа характеризуется активностью гистондеметилазы, и другая эффекторная функциональная группа характеризуется активностью ДНК-метилтрансферазы. В некоторых вариантах осуществления первая или вторая эффекторная функциональная группа характеризуется активностью гистонметилтрансферазы, и другая эффекторная функциональная группа характеризуется активностью ДНК-деметилазы. В некоторых вариантах осуществления первая или вторая эффекторная функциональная группа характеризуется активностью гистондеметилазы, и другая эффекторная функциональная группа характеризуется активностью репрессора транскрипции. В некоторых вариантах осуществления первая или вторая эффекторная функциональная группа характеризуется активностью гистондеметилазы, и другая эффекторная функциональная группа характеризуется активностью отличающейся гистондеметилазы. В некоторых вариантах осуществления первая или вторая эффекторная функциональная группа характеризуется активностью гистондеметилазы, и другая эффекторная функциональная группа характеризуется активностью такой же гистондеметилазы. В некоторых вариантах осуществления первая или вторая эффекторная функциональная группа характеризуется активностью гистондеацетилазы, и другая эффекторная функциональная группа характеризуется активностью ДНК-метилтрансферазы. В некоторых вариантах осуществления первая или вторая эффекторная функциональная группа характеризуется активностью гистондеацетилазы, и другая эффекторная функциональная группа характеризуется активностью ДНК-деметилазы. В некоторых вариантах осуществления первая или вторая эффекторная функциональная группа характеризуется активностью гистондеацетилазы, и другая эффекторная функциональная группа характеризуется активностью репрессора транскрипции. В некоторых вариантах осуществления первая или вторая эффекторная функциональная группа характеризуется активностью гистондеацетилазы, и другая эффекторная функциональная группа характеризуется активностью отличающейся гистондеацетилазы. В некоторых вариантах осуществления первая или вторая эффекторная функциональная группа характеризуется активностью гистондеацетилазы, и другая эффекторная функциональная группа характеризуется активностью той же гистондеацетилазы. В некоторых вариантах осуществления первая или вторая эффекторная функциональная группа характеризуется активностью ДНК-метилтрансферазы, и другая эффекторная функциональная группа характеризуется активностью ДНК-деметилазы. В некоторых вариантах осуществления первая или вторая эффекторная функциональная группа характеризуется активностью ДНК-деметилазы, и другая эффекторная функциональная группа характеризуется активностью репрессора транскрипции. В некоторых вариантах осуществления первая или вторая эффекторная

функциональная группа характеризуется активностью ДНК-метилтрансферазы, и другая эффекторная функциональная группа характеризуется активностью отличающейся ДНК-метилтрансферазы. В некоторых вариантах осуществления первая или вторая эффекторная функциональная группа характеризуется активностью ДНК-метилтрансферазы, и другая эффекторная функциональная группа характеризуется активностью такой же ДНК-метилтрансферазы. В некоторых вариантах осуществления первая или вторая эффекторная функциональная группа характеризуется активностью ДНК-деметилазы, и другая эффекторная функциональная группа характеризуется активностью репрессора транскрипции. В некоторых вариантах осуществления первая или вторая эффекторная функциональная группа характеризуется активностью ДНК-деметилазы, и другая эффекторная функциональная группа характеризуется активностью отличающейся ДНК-деметилазы. В некоторых вариантах осуществления первая или вторая эффекторная функциональная группа характеризуется активностью ДНК-деметилазы, и другая эффекторная функциональная группа характеризуется активностью той же ДНК-деметилазы. В некоторых вариантах осуществления первая или вторая эффекторная функциональная группа характеризуется активностью репрессора транскрипции, и другая эффекторная функциональная группа характеризуется активностью отличающегося репрессора транскрипции. В некоторых вариантах осуществления первая или вторая эффекторная функциональная группа характеризуется активностью репрессора транскрипции, и другая эффекторная функциональная группа характеризуется активностью того же репрессора транскрипции.

В некоторых вариантах осуществления система репрессоров экспрессии содержит три или более репрессоров экспрессии, и при этом два или более репрессоров экспрессии содержат одну и ту же функциональную группу, нацеливающуюся на ДНК. Например, система репрессоров экспрессии может содержать три репрессора экспрессии, где оба из первого и второго репрессоров экспрессии содержат первую эффекторную функциональную группу, а третий репрессор экспрессии содержит вторую отличающуюся эффекторную функциональную группу. В качестве дополнительного примера система репрессоров экспрессии может содержать четыре репрессора экспрессии, где оба из первого и второго репрессоров экспрессии содержат первую эффекторную функциональную группу, а третий и четвертый репрессоры экспрессии содержат вторую отличающуюся эффекторную функциональную группу. В качестве дополнительного примера система репрессоров экспрессии может содержать пять репрессоров экспрессии, где оба из первого и второго репрессоров экспрессии содержат первую эффекторную функциональную группу, оба из третьего и четвертого репрессоров экспрессии содержат вторую отличающуюся эффекторную функциональную группу, а пятый репрессор экспрессии содержит третью отличающуюся эффекторную функциональную группу. Как описано выше, "отличающийся" может означать, что они содержат различные типы эффекторной функциональной группы или содержат отличающиеся варианты одного и того же типа эффекторной функциональной группы.

В некоторых вариантах осуществления два или более (например, все) репрессоров экспрессии системы репрессоров экспрессии являются нековалентно ассоциированными друг с другом, например каждый репрессор экспрессии является нековалентно ассоциированным с каким-либо другим репрессором экспрессии. В другом варианте осуществления два или более репрессоров экспрессии системы репрессоров экспрессии являются ковалентно ассоциированными друг с другом. В одном варианте осуществления система репрессии экспрессии содержит первый репрессор экспрессии и второй репрессор экспрессии, расположенные в одном и том же полипептиде, например, в виде слитой молекулы, например соединенные пептидной связью и необязательно линкером. В некоторых вариантах осуществления пептид представляет собой саморасщепляющийся пептид, например саморасщепляющийся пептид T2A. В одном варианте осуществления система репрессии экспрессии содержит первый репрессор экспрессии и второй репрессор экспрессии, которые соединены непептидной связью, например конъюгированы друг с другом.

Линкеры

Репрессор экспрессии или система репрессоров экспрессии, раскрытые в данном документе, могут содержать один или несколько линкеров. Линкер может соединять нацеливающуюся функциональную группу с эффекторной функциональной группой, эффекторную функциональную группу с другой эффекторной функциональной группой или нацеливающуюся функциональную группу с другой нацеливающейся функциональной группой. Линкер может представлять собой химическую связь, например одну или несколько ковалентных связей или нековалентных связей. В некоторых вариантах осуществления линкер является ковалентным. В некоторых вариантах осуществления линкер является нековалентным. В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой пептидный линкер. Такой линкер может иметь длину, составляющую 2-30, 5-30, 10-30, 15-30, 20-30, 25-30, 2-25, 5-25, 10-25, 15-25, 20-25, 2-20, 5-20, 10-20, 15-20, 2-15, 5-15, 10-15, 2-10, 5-10, или 2-5 аминокислот, или большую чем 2, 5, 10, 15, 20, 25 или 30 аминокислот или равную указанным значениям (и необязательно длину до 50, 40, 30, 25, 20, 15, 10 или 5 аминокислот). В некоторых вариантах осуществления линкер можно применять для отделения первых домена или функциональной группы от вторых домена или функциональной группы, например функциональной группы, нацеливающейся на ДНК, от эффекторной функциональной группы. В некоторых вариантах осуществления, например, линкер может быть расположен между функциональной группой, нацеливающейся на ДНК, и эффекторной функциональной группой, например, с обеспечением молекулярной гибкости вторичных и третичных структур. Линкер может предусматривать гибкие, жесткие и/или расщепляемые линкеры, описанные в данном документе. В некоторых вариантах осуществления линкер содержит по меньшей мере одну аминокислоту глицин, аланин и серин с обеспечением гибкости. В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой гидрофобный линкер, такой как в том числе отрицательно

заряженную сульфонатную группу, полиэтиленгликольную группу (PEG) или пирофосфатную сложнодиэфирную группу. В некоторых вариантах осуществления линкер является расщепляемым с селективным высвобождением функциональной группы (например, полипептида) из модулирующего средства, но достаточно стабильным для предупреждения преждевременного расщепления.

В некоторых вариантах осуществления одно или несколько из функциональных групп и/или доменов репрессора экспрессии, описанных в данном документе, связаны с одним или несколькими линкерами. В некоторых вариантах осуществления репрессия экспрессии может предусматривать линкер, расположенный между нацеливающейся функциональной группой и эффекторной функциональной группой. В некоторых вариантах осуществления линкер может иметь последовательность ASGSGGGSGGARD (SEQ ID NO: 137) или ASGSGGGSGG (SEQ ID NO: 138). В некоторых вариантах осуществления система, содержащая первый и второй репрессор, может содержать первый линкер, расположенный между первой нацеливающейся функциональной группой и первой эффекторной функциональной группой, и второй линкер, расположенный между второй нацеливающейся функциональной группой и второй эффекторной функциональной группой. В некоторых вариантах осуществления первый и второй линкеры могут быть идентичными. В некоторых вариантах осуществления первый и второй линкеры могут быть отличающимися. В некоторых вариантах осуществления первый линкер может содержать аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 137 или последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 99 или 100% идентичностью с ней, и второй линкер может содержать аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 138 или последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 99 или 100% идентичностью с ней.

Как будет известно специалисту в данной области, обычно используемые гибкие линкеры имеют последовательности, состоящие в основном из отрезков остатков Gly и Ser ("GS"-линкер). Гибкие линкеры могут быть применимы для соединения доменов/функциональных групп, которые требуют определенной степени подвижности или взаимодействия, и могут содержать небольшие неполярные (например, Gly) или полярные (например, Ser или Thr) аминокислоты. Включение Ser или Thr также может обеспечивать поддержание стабильности линкера в водных растворах благодаря образованию водородных связей с молекулами воды и, следовательно, уменьшение неблагоприятных взаимодействий между линкером и функциональными группами/доменами. В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой GS-линкер или его вариант, например G4S (SEQ ID NO: 207).

Жесткие линкеры применимы для сохранения фиксированного расстояния между доменами/функциональными группами и поддержания их независимых функций. Жесткие линкеры также могут быть применимы, если пространственное разделение доменов является критически важным для сохранения стабильности или биологической активности одного или нескольких компонентов в продукте слияния. Жесткие линкеры могут иметь

альфа-спиральную структуру или Pro-богатую последовательность $(XP)_n$, при этом X обозначает любую аминокислоту, предпочтительно Ala, Lys или Glu.

Расщепляемые линкеры могут высвобождать свободные функциональные домены in vivo. В некоторых вариантах осуществления линкеры могут расщепляться в специфических условиях, таких как присутствие восстанавливающих реагентов или протеаз. В расщепляемых in vivo линкерах может использоваться обратимая природа дисульфидной связи. Один пример включает в себя последовательность, чувствительную к тромбину (например, PRS), между двумя остатками Cys. Обработка тромбином CPRSC in vitro приводит к расщеплению чувствительной к тромбину последовательности, тогда как обратимая дисульфидная связь остается интактной. Такие линкеры известны и описаны, например, в Chen et al., 2013. Fusion Protein Linkers: Property, Design and Functionality. Adv Drug Deliv Rev. 65(10): 1357-1369. Расщепление линкеров in vivo в продуктах слияния может также осуществляться протеазами, которые экспрессируются in vivo при определенных условиях в конкретных клетках или тканях или ограничены определенными клеточными компартментами. Специфичность многих протеаз обеспечивает более медленное расщепление линкера в ограниченных компартментах. В некоторых вариантах осуществления расщепляемый линкер может представлять собой саморасщепляющийся линкер, например пептидный линкер T2A. В некоторых вариантах осуществления линкер может содержать "пропускаемую рибосомами" последовательность, например линкер tPT2A.

Примеры молекул, подходящих для использования в линкерах, описанных в данном документе, включают отрицательно заряженную сульфонатную группу; липиды, такие как поли(--$CH_2$--)углеводородные цепи, такие как полиэтиленгликолевая (PEG) группа, их ненасыщенные варианты, их гидроксилированные варианты, их амидированные или иным образом N-содержащие варианты; неуглеродные линкеры; углеводные линкеры; сложные фосфодиэфирные линкеры или другие молекулы, способные ковалентно связывать два или более компонентов репрессора экспрессии. Также включены нековалентные линкеры, такие как гидрофобные липидные глобулы, с которыми связывается полипептид, например, посредством гидрофобной области полипептида или гидрофобного удлинения полипептида, такого как ряд остатков, богатый лейцином, изолейцином, валином или возможно также аланином, фенилаланином или даже тирозином, метионином, глицином или другими гидрофобными остатками. Компоненты репрессора экспрессии могут быть связаны с использованием химического взаимодействия зарядов, так что положительно заряженный компонент репрессора экспрессии связан с отрицательным заряженным другим компонентом.

Нацеливающиеся функциональные группы

Настоящее изобретение предусматривает, например, репрессоры экспрессии, содержащие нацеливающуюся функциональную группу, которая специфически целенаправленно воздействует, например связывает, на элемент геномной последовательности (например, промотор, TSS или якорную последовательность) в гене-

мишени, расположенный проксимально относительно него и/или функционально связанный с ним. Нацеливающиеся функциональные группы могут специфически связываться с последовательностью ДНК, например последовательностью ДНК, ассоциированной с геном-мишенью, например MYC. Любые молекулу или соединение, которые специфически связываются с последовательностью ДНК, можно применять в качестве нацеливающейся функциональной группы.

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

В некоторых вариантах осуществления нацеливающаяся функциональная группа может представлять собой или предусматривать домен CRISPR/Cas, эффекторный домен TAL, домен по типу "Zn-пальца", пептидную нуклеиновую кислоту (PNA) или молекулу нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления репрессор экспрессии содержит одну эффекторную функциональную группу. В некоторых вариантах осуществления репрессор экспрессии содержит множество нацеливающихся функциональных групп, где каждая нацеливающаяся функциональная группа не связывается выявляемым образом, например не связывается, с другой нацеливающейся функциональной группой. В некоторых вариантах осуществления система репрессии экспрессии содержит множество репрессоров экспрессии, где каждый представитель из множества репрессоров экспрессии содержит нацеливающуюся функциональную группу, где каждая нацеливающаяся функциональная группа не связывается выявляемым образом, например не связывается, с другой нацеливающейся функциональной группой. В некоторых вариантах осуществления система репрессии экспрессии содержит первый репрессор экспрессии, содержащий первую нацеливающуюся функциональную группу, и второй репрессор экспрессии, содержащий вторую нацеливающуюся функциональную группу, где первая нацеливающаяся функциональная группа не связывается выявляемым

образом, например не связывается, со второй нацеливающейся функциональной группой. В некоторых вариантах осуществления система репрессии экспрессии содержит первый репрессор экспрессии, содержащий первую нацеливающуюся функциональную группу, и второй репрессор экспрессии, содержащий вторую нацеливающуюся функциональную группу, где первая нацеливающаяся функциональная группа не связывается выявляемым образом, например не связывается, с другой первой нацеливающейся функциональной группой, и вторая нацеливающаяся функциональная группа не связывается выявляемым образом, например не связывается, с другой второй нацеливающейся функциональной группой. В некоторых вариантах осуществления нацеливающаяся функциональная группа для применения в композициях и способах, описанных в данном документе, является функциональной (например, связывается с последовательностью ДНК) в мономерном состоянии, например отличном от димерного.

В некоторых вариантах осуществления связывание целенаправленно воздействующей функциональной группы с целевым компонентом снижает аффинность связывания целевого компонента с другим фактором транскрипции, компонентом геномного комплекса или элементом геномной последовательности. В некоторых вариантах осуществления нацеливающаяся функциональная группа связывается со своей последовательностью-мишенью с $K_D$, меньшей или равной 500, 450, 400, 350, 300, 250, 200, 150, 100, 50, 40, 30, 20, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1, 0,9, 0,8, 0,7, 0,6, 0,5, 0,4, 0,3, 0,2, 0,1, 0,09, 0,08, 0,07, 0,06, 0,05, 0,04, 0,03, 0,02, 0,01, 0,005, 0,002, или 0,001 нМ (и необязательно $K_D$, составляющей по меньшей мере 50, 40, 30, 20, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1, 0,9, 0,8, 0,7, 0,6, 0,5, 0,4, 0,3, 0,2, 0,1, 0,09, 0,08, 0,07, 0,06, 0,05, 0,04, 0,03, 0,02, 0,01, 0,005, 0,002, или 0,001 нМ). В некоторых вариантах осуществления нацеливающаяся функциональная группа связывается со своей последовательностью-мишенью с $K_D$, составляющей от 0,001 нМ до 500 нМ, например от 0,1 нМ до 5 нМ, например приблизительно 0,5 нМ. В некоторых вариантах осуществления нацеливающаяся функциональная группа связывается с последовательностью, не являющейся мишенью, с $K_D$, составляющей по меньшей мере 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 2000, 5000, 10000 или 100000 нМ (и необязательно не связывается в значительной степени с последовательностью, не являющейся мишенью). В некоторых вариантах осуществления нацеливающаяся функциональная группа не связывается с последовательностью, не являющейся мишенью.

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

В некоторых вариантах осуществления нацеливающаяся функциональная группа может представлять собой или предусматривать домен CRISPR/Cas, эффекторный домен TAL, домен по типу "Zn-пальца" или молекулу нуклеиновой кислоты.

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

Репрессор экспрессии или система, содержащая репрессор, раскрытые в данном документе, могут содержать нуклеиновую кислоту, например одну или несколько нуклеиновых кислот. Термин "нуклеиновая кислота" относится к любому соединению, которое включено или может быть включено в олигонуклеотидную цепь. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота представляет собой соединение и/или

вещество, которое включено или может быть включено в олигонуклеотидную цепь посредством фосфодиэфирной связи. Как будет понятно из контекста, в некоторых вариантах осуществления "нуклеиновая кислота" относится к отдельному остатку нуклеиновой кислоты (например, нуклеотиду и/или нуклеозиду); в некоторых вариантах осуществления "нуклеиновая кислота" относится к олигонуклеотидной цепи, содержащей отдельные остатки нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления "нуклеиновая кислота" представляет собой или содержит РНК; в некоторых вариантах осуществления "нуклеиновая кислота" представляет собой или содержит ДНК. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота представляет собой или содержит более 50% рибонуклеотидов и упоминается в данном документе как рибонуклеиновая кислота (РНК). В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота представляет собой, содержит или состоит из одного или нескольких остатков природной нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота представляет собой, содержит или состоит из одного или нескольких аналогов нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления аналог нуклеиновой кислоты отличается от нуклеиновой кислоты тем, что в нем не используется фосфодиэфирный каркас. Например, в некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота представляет собой, содержит или состоит из одной или нескольких "пептидных нуклеиновых кислот", которые известны из уровня техники и имеют пептидные связи вместо фосфодиэфирных связей в каркасе, рассматриваются как входящие в объем настоящего изобретения. В качестве альтернативы или дополнения, в некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота имеет одну или несколько фосфотиоатных и/или 5'-N-фосфорамидитных связей вместо фосфодиэфирных связей. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота представляет собой, содержит или состоит из одного или нескольких природных нуклеозидов (например, аденозина, тимидина, гуанозина, цитидина, уридина, дезоксиаденозина, дезокситимидина, дезоксигуанозина и дезоксицитидина). В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота представляет собой, содержит или состоит из одного или нескольких аналогов нуклеозидов (например, 2-аминоаденозина, 2-тиотимидина, инозина, пирролопиримидина, 3-метиладенозина, 5-метилцитидина, C5-пропинилцитидина, C5-пропинилуридина, 2-аминоаденозина, C5-бромуридина, C5-фторуридина, C5-йодуридина, C5-пропинилуридина, C5-пропинилцитидина, C5-метилцитидина, 2-аминоаденозина, 7-деазааденозина, 7-деазагуанозина, 8-оксоаденозина, 8-оксогуанозина, 0(6)-метилгуанина, 2-тиоцитидина, метилированных оснований, интеркалированных оснований и их комбинаций). В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота содержит один или несколько модифицированных сахаров (например, 2'-фторрибозу, рибозу, 2'-дезоксирибозу, арабинозу и гексозу) по сравнению с природными нуклеиновыми кислотами. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота имеет нуклеотидную последовательность, которая кодирует функциональный генный продукт, такой как РНК или белок. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота

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

В некоторых вариантах осуществления нацеливающаяся функциональная группа содержит или представляет собой последовательность нуклеиновой кислоты, белок, слитый белок или транслоцирующий мембрану полипептид. В некоторых вариантах осуществления нацеливающаяся функциональная группа выбрана из экзогенной нуклеирующей молекулы, образующей объединение, нуклеиновой кислоты, кодирующей нуклеирующую молекулу, образующей объединение, или продукта слияния последовательности нацеливающегося полипептида и нуклеирующей молекулы, образующей объединение. Нуклеирующая молекула, образующая объединение, может представлять собой, например, CTCF, когезин, USF1, YY1, фактор 3, ассоциированный с

TATA-бокс-связывающим белком (TAF3), ZNF143-связывающий мотив. В некоторых вариантах осуществления нацеливающаяся функциональная группа содержит или представляет собой полимер или полимерную функциональную группу, например полимер из нуклеотидов (такой как олигонуклеотид), пептидную нуклеиновую кислоту, миксмер пептид-нуклеиновой кислоты, пептид или полипептид, полиамид, углевод и т. д.

В некоторых вариантах осуществления нацеливающаяся функциональная группа содержит или представляет собой нуклеиновую кислоту. В некоторых вариантах осуществления эффекторная функциональная группа содержит или представляет собой нуклеиновую кислоту. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота, которая может быть включена в функциональную группу, может представлять собой или предусматривать ДНК, РНК и/или искусственную или синтетическую нуклеиновую кислоту или аналог или имитатор нуклеиновой кислоты. Например, в некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота может представлять собой или предусматривать одно или несколько из геномной ДНК (gDNA), комплементарной ДНК (cDNA), пептидной нуклеиновой кислоты (PNA), смеси пептид-нуклеиновая кислота, конъюгата пептид-олигонуклеотид, запертой нуклеиновой кислоты (LNA), мостиковой нуклеиновой кислоты (BNA), полиамида, триплекс-образующего олигонуклеотида, антисмыслового олигонуклеотида, tRNA, mRNA, rRNA, miRNA, gRNA, siRNA или другой молекулы RNAi (например, которая целенаправленно воздействует на некодирующую РНК, которая описана в данном документе, и/или которая целенаправленно воздействует на продукт экспрессии конкретного гена, ассоциированного с целевым геномным комплексом, который описан в данном документе) и т. д. Последовательность нуклеиновой кислоты, подходящая для применения в модулирующем средстве, может содержать модифицированные олигонуклеотиды (например, химические модификации, такие как модификации, которые изменяют каркасные связи, молекулы сахара и/или основания нуклеиновых кислот) и/или искусственные нуклеиновые кислоты. В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты предусматривает без ограничения геномную ДНК, cDNA, пептидные нуклеиновые кислоты (PNA) или конъюгаты пептидных олигонуклеотидов, запертые нуклеиновые кислоты (LNA), мостиковые нуклеиновые кислоты (BNA), полиамиды, триплекс-образующие олигонуклеотиды, модифицированную ДНК, антисмысловые олигонуклеотиды ДНК, tRNA, mRNA, rRNA, модифицированные РНК, miRNA, gRNA и siRNA или другие молекулы РНК или ДНК. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота может содержать один или несколько остатков, которые не являются встречающимися в природе остатками ДНК или РНК, может содержать одну или несколько связей, которые не являются сложными фосфодиэфирными связями (например, это могут быть, например, тиофосфатные связи и т. д.), и/или может предусматривать одну или несколько модификаций, таких как, например, модификация 2'O, такая как 2'-OmeP. Из уровня техники известны различные структуры нуклеиновых кислот, пригодные для получения синтетических нуклеиновых кислот (см., например, WO 2017/062862l и WO 2014/012081),

при этом специалисты в данной области поймут, что их можно применять в соответствии с настоящим изобретением.

Некоторые примеры нуклеиновых кислот включают без ограничения нуклеиновую кислоту, которая гибридизуется с геном-мишенью, например MYC (например, gRNA или антисмысловая ssDNA, которые описаны в данном документе в другом месте), нуклеиновую кислоту, которая гибридизуется с экзогенной нуклеиновой кислотой, такую как вирусная ДНК или РНК, нуклеиновую кислоту, которая гибридизуется с РНК, нуклеиновую кислоту, которая препятствует транскрипции генов, нуклеиновую кислоту, которая препятствует трансляции РНК, нуклеиновую кислоту, которая стабилизирует РНК или дестабилизирует РНК, например путем целенаправленного воздействия с целью разрушения, нуклеиновую кислоту, которая препятствует фактору связывания ДНК или РНК посредством препятствования его экспрессии или его функции, нуклеиновую кислоту, которая связана с внутриклеточным белком или белковым комплексом и модулирует его функцию, и т. д.

В некоторых вариантах осуществления репрессор экспрессии содержит один или несколько аналогов нуклеозидов. В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты может включать, в дополнение или вместо одного или нескольких природных нуклеозидов, например пуринов или пиримидинов, например аденина, цитозина, гуанина, тимина и урацила, один или несколько аналогов нуклеозидов. В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты содержит дин или несколько аналогов нуклеозидов. Аналог нуклеозида может предусматривать без ограничения аналог нуклеозида, такой как 5-фторурацил; 5-бромурацил, 5-хлорурацил, 5-йодурацил, гипоксантин, ксантин, 4-ацетилцитозин, 4-метилбензимидазол, 5-(карбоксигидроксилметил)урацил, 5-карбоксиметиламинометил-2-тиоуридин, 5-карбоксиметиламинометилурацил, дигидроурацил, дигидроуридин, бета-D-галактозилквеуозин, инозин, N6-изопентениладенин, 1-метилгуанин, 1-метилинозин, 2,2-диметилгуанин, 2-метиладенин, 2-метилгуанин, 3-метилцитозин, 5-метилцитозин, N6-аденин, 7-метилгуанин, 5-метиламинометилурацил, 5-метоксиаминометил-2-тиоурацил, бета-D-маннозилквеуозин, 5'-метоксикарбоксиметилуарцил, 5-метоксиурацил, 2-метилтио-N6-изопентениладенин, урацил-5-оксиуксусная кислота (v), вибутоксозин, псевдоурацил, квеуозин, 2-тиоцитозин, 5-метил-2-тиоурацил, 2-тиоурацил, 4-тиоурацил, 5-метилурацил, сложный метиловый эфир урацил-5-оксиуксусной кислоты, урацил-5-оксиуксусная кислота (v), 5-метил-2-тиоурацил, 3-(3-амино-3-N-2-карбоксипропил)урацил, (acp3)w, 2,6-диаминопурин, 3-нитропиррол, инозин, тиоуридин, квеуозин, виозин, диаминопурин, изогуанин, изоцитозин, диаминопиримидин, 2,4-дифтортолуол, изохинолин, пирроло[2,3-β]пиридин и любые другие, которые могут образовывать пары оснований с пуриновой или пиримидиновой боковой цепью.

Домены CRISPR/Cas

В некоторых вариантах осуществления нацеливающаяся функциональная группа представляет собой или предусматривает домен CRISPR/Cas. Белок CRISPR/Cas может

содержать эффектор CRISPR/Cas и необязательно один или несколько других доменов. Домен CRISPR/Cas обычно имеет структурное и/или функциональное сходство с белком, участвующим в системе кластерных регуляторных коротких палиндромных повторов (CRISPR), например с белком Cas. Домен CRISPR/Cas необязательно содержит направляющую РНК, например одиночную направляющую РНК (sgRNA). В некоторых вариантах осуществления gRNA, содержащаяся в домене CRISPR/Cas, нековалентно связана с доменом CRISPR/Cas.

Системы CRISPR представляют собой адаптивные системы защиты, изначально обнаруженные у бактерий и архей. В системах CRISPR используются РНК-направляемые нуклеазы, называемые CRISPR-ассоциированными эндонуклеазами или эндонуклеазами "Cas" (например, Cas9 или Cpf1), для расщепления чужеродной ДНК. Например, в типичной системе CRISPR/Cas эндонуклеаза направляется на нуклеотидную последовательность-мишень (например, сайт в геноме, который подлежит редактированию последовательности) с помощью специфичных в отношении последовательности некодирующих "направляющих РНК", которые целенаправленно воздействуют на одно- или двухнитевые последовательности ДНК. Идентифицированы три класса (I-III) систем CRISPR. В системах CRISPR II класса используется одна эндонуклеаза Cas (вместо нескольких белков Cas). Одна система CRISPR II класса содержит эндонуклеазу Cas II типа, такую как Cas9, CRISPR-РНК ("crRNA") и транс-активирующую crRNA ("tracrRNA"). crRNA содержит "направляющую РНК", обычно последовательность РНК длиной приблизительно 20 нуклеотидов, которая соответствует последовательности ДНК-мишени. crRNA также содержит область, которая связывается с tracrRNA с образованием частично двухнитевой структуры, которая расщепляется РНКазой III с получением в результате гибрида crRNA/tracrRNA. Затем гибрид crRNA/tracrRNA направляет эндонуклеазу Cas9 для распознавания и расщепления последовательности ДНК-мишени. Последовательность ДНК-мишень, как правило, должна прилегать к "мотиву, прилегающему к протоспейсеру" (PAM), который является специфическим для рассматриваемой эндонуклеазы Cas; однако последовательности PAM встречаются по всему рассматриваемому геному. Эндонуклеазы CRISPR, идентифицированные у различных видов прокариот, имеют уникальные требования к последовательности PAM; примеры последовательностей PAM включают 5'-NGG (Streptococcus pyogenes), 5'-NNAGAA (CRISPR1 Streptococcus thermophilus), 5'-NGGNG (CRISPR3 Streptococcus thermophilus) и 5'-NNNGATT (Neisseria meningitidis). Некоторые эндонуклеазы, например эндонуклеазы Cas9, ассоциированы с G-богатыми сайтами PAM, например с 5'-NGG, и осуществляют расщепление ДНК-мишени с образованием "тупых" концов в местоположении на 3 нуклеотида выше сайта PAM (с 5'-стороны от него). Другая система CRISPR II класса содержит эндонуклеазу Cpf1 V типа, которая имеет меньший размер, чем Cas9; примеры включают AsCpf1 (из Acidaminococcus sp.) и LbCpf1 (из Lachnospiraceae sp.). Cpf1-ассоциированные матрицы CRISPR подвергаются процессингу в зрелые crRNA без потребности в tracrRNA; другими словами, в случае системы Cpf1 для

расщепления последовательности ДНК-мишени требуется только нуклеаза Cpf1 и crRNA. Эндонуклеазы Cpf1 ассоциированы с Т-богатыми сайтами PAM, например с 5'-TTN. Cpf1 также может распознавать PAM-мотив 5'-CTA. Cpf1 расщепляет ДНК-мишень посредством введения смещенного или ступенчатого двухнитевого разрыва с образованием выступающего 5'-конца длиной 4 или 5 нуклеотидов, например посредством расщепления ДНК-мишени с образованием смещенного или ступенчатого разреза, охватывающего 5 нуклеотидов, расположенного на 18 нуклеотидов ниже сайта PAM (с 3'-стороны от него) на кодирующей нити и на 23 нуклеотида ниже сайта PAM на комплементарной нити; при этом выступающий конец длиной 5 нуклеотидов, который образуется в результате такого смещенного расщепления, обеспечивает возможность более точного редактирования генома за счет вставки ДНК посредством гомологичной рекомбинации по сравнению со вставкой в ДНК при расщеплении с образованием тупых концов. См., например, Zetsche et al. (2015) Cell, 163:759-771.

Различные CRISPR-ассоциированные (Cas) гены или белки можно применять в технологиях, предусмотренных настоящим изобретением, и выбор белка Cas будет зависеть от конкретных условий способа. Конкретные примеры белков Cas включают системы класса II, в том числе Cas1, Cas2, Cas3, Cas4, Cas5, Cas6, Cas7, Cas8, Cas9, Cas10, Cpf1, C2C1 или C2C3. В некоторых вариантах осуществления белок Cas, например белок Cas9, можно получать из любого из разнообразных видов прокариот. В некоторых вариантах осуществления конкретный белок Cas, например конкретный белок Cas9, выбран для распознавания конкретной последовательности мотива, прилегающего к протоспейсеру (PAM). В некоторых вариантах осуществления функциональная группа, нацеливающаяся на ДНК, содержит последовательность, нацеливающуюся на полипептид, такую как белка Cas, например Cas9. В определенных вариантах осуществления белок Cas, например белок Cas9, можно получать из бактерий или архей или синтезировать с применением известных способов. В определенных вариантах осуществления белок Cas можно получать из грамположительной бактерии или грамотрицательной бактерии. В определенных вариантах осуществления белок Cas можно получать из бактерий рода Streptococcus (например, S. pyogenes или S. thermophilus), Francisella (например, F. novicida), Staphylococcus (например, S. aureus), Acidaminococcus (например, BV3L6 Acidaminococcus sp.), Neisseria (например, N. meningitidis), Cryptococcus, Corynebacterium, Haemophilus, Eubacterium, Pasteurella, Prevotella, Veillonella или Marinobacter.

В некоторых вариантах осуществления в случае белка Cas требуется, чтобы мотив, прилегающий к протоспейсеру (PAM), присутствовал в последовательности ДНК-мишени или прилегал к ней для того, чтобы белок Cas мог связываться и/или функционировать. В некоторых вариантах осуществления PAM представляет собой или содержит, в направлении от 5'- к 3'-концу, следующее: NGG, YG, NNGRRT, NNNRRT, NGA, TYCV, TATV, NTTN или NNNGATT, где N означает любой нуклеотид, Y означает C или T, R означает A или G, а V означает A, C или G. В некоторых вариантах осуществления белок

Cas представляет собой белок, указанный в таблице 1. В некоторых вариантах осуществления белок Cas содержит одну или несколько мутаций, обеспечивающих изменение его PAM. В некоторых вариантах осуществления белок Cas содержит мутации E1369R, E1449H и R1556A или аналогичные замены аминокислот, соответствующих указанным положениям. В некоторых вариантах осуществления белок Cas содержит мутации E782K, N968K и R1015H или аналогичные замены аминокислот, соответствующих указанным положениям. В некоторых вариантах осуществления белок Cas содержит мутации D1135V, R1335Q и T1337R или аналогичные замены аминокислот, соответствующих указанным положениям. В некоторых вариантах осуществления белок Cas содержит мутации S542R и K607R или аналогичные замены аминокислот, соответствующих указанным положениям. В некоторых вариантах осуществления белок Cas содержит мутации S542R, K548V и N552R или аналогичные замены аминокислот, соответствующих указанным положениям.

Таблица 1

| *Название* | *Фермент* | *Вид* | *Кол-во АК* | PAM | *Мутации для изменения распознавания* PAM | *Мутации для обеспечения каталитической инертности* |
|---|---|---|---|---|---|---|
| FnCas9 | Cas9 | Francisella novicida | 1629 | 5'-NGG-3' | Wt | D11A/H969A/N995A |
| FnCas9 RHA | Cas9 | Francisella novicida | 1629 | 5'-YG-3' | E1369R/E1449H/R1556A | D11A/H969A/N995A |
| SaCas9 | Cas9 | Staphylococcus aureus | 1053 | 5'-NNGRRT-3' | Wt | D10A/H557A |
| SaCas9 KKH | Cas9 | Staphylococcus aureus | 1053 | 5'-NNNRRT-3' | E782K/N968K/R1015H | D10A/H557A |
| SpCas9 | Cas9 | Streptococcus pyogenes | 1368 | 5'-NGG-3' | Wt | D10A/D839A/H840A/N863A |
| SpCas9 VQR | Cas9 | Streptococcus pyogenes | 1368 | 5'-NGA-3' | D1135V/R1335Q/T1337R | D10A/D839A/H840A/N863A |
| AsCpf1 RR | Cpf1 | BV3L6 Acidaminococcus sp. | 1307 | 5'-TYCV-3' | S542R/K607R | E993A |

| | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| AsCpf1 RVR | Cpf1 | BV3L6 Acidaminococcus sp. | 1307 | 5'-TATV-3' | S542R/K548V/N552R | E993A |
| FnCpf1 | Cpf1 | Francisella novicida | 1300 | 5'-NTTN-3' | Wt | D917A/E1006A/D1255A |
| NmCas9 | Cas9 | Neisseria meningitidis | 1082 | 5'-NNNGATT-3' | Wt | D16A/D587A/H588A/N611A |

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

В некоторых вариантах осуществления каталитически неактивный белок Cas9, например dCas9, содержит мутацию D11A или аналогичную замену аминокислоты, соответствующей указанному положению. В некоторых вариантах осуществления каталитически неактивный белок Cas9, например dCas9, содержит мутацию H969A или аналогичную замену аминокислоты, соответствующей указанному положению. В некоторых вариантах осуществления каталитически неактивный белок Cas9, например dCas9, содержит мутацию N995A или аналогичную замену аминокислоты, соответствующей указанному положению. В некоторых вариантах осуществления каталитически неактивный белок Cas9, например dCas9, содержит мутации D11A, H969A и N995A или аналогичные замены аминокислот, соответствующих указанным положениям.

В некоторых вариантах осуществления каталитически неактивный белок Cas9, например dCas9, содержит мутацию D10A или аналогичную замену аминокислоты, соответствующей указанному положению. В некоторых вариантах осуществления каталитически неактивный белок Cas9, например dCas9, содержит мутацию H557A или аналогичную замену аминокислоты, соответствующей указанному положению. В некоторых вариантах осуществления каталитически неактивный белок Cas9, например

dCas9, содержит мутации D10A и H557A или аналогичные замены аминокислот, соответствующих указанным положениям.

В некоторых вариантах осуществления каталитически неактивный белок Cas9, например dCas9, содержит мутацию D839A или аналогичную замену аминокислоты, соответствующей указанному положению. В некоторых вариантах осуществления каталитически неактивный белок Cas9, например dCas9, содержит мутацию H840A или аналогичную замену аминокислоты, соответствующей указанному положению. В некоторых вариантах осуществления каталитически неактивный белок Cas9, например dCas9, содержит мутацию N863A или аналогичную замену аминокислоты, соответствующей указанному положению. В некоторых вариантах осуществления каталитически неактивный белок Cas9, например dCas9, содержит мутации D10A, D839A, H840A и N863A или аналогичные замены аминокислот, соответствующих указанным положениям.

В некоторых вариантах осуществления каталитически неактивный белок Cas9, например dCas9, содержит мутацию E993A или аналогичную замену аминокислоты, соответствующей указанному положению.

В некоторых вариантах осуществления каталитически неактивный белок Cas9, например dCas9, содержит мутацию D917A или аналогичную замену аминокислоты, соответствующей указанному положению. В некоторых вариантах осуществления каталитически неактивный белок Cas9, например dCas9, содержит мутацию E1006A или аналогичную замену аминокислоты, соответствующей указанному положению. В некоторых вариантах осуществления каталитически неактивный белок Cas9, например dCas9, содержит мутацию D1255A или аналогичную замену аминокислоты, соответствующей указанному положению. В некоторых вариантах осуществления каталитически неактивный белок Cas9, например dCas9, содержит мутации D917A, E1006A и D1255A или аналогичные замены аминокислот, соответствующих указанным положениям.

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

В другом аспекте настоящее изобретение направлено на репрессор экспрессии или полипептид, содержащие одну или несколько (например, одну) нацеливающихся функциональных групп и одну или несколько эффекторных функциональных групп, где одна или несколько нацеливающихся функциональных групп представляют собой или предусматривают домен CRISPR/Cas, содержащий белок Cas, например каталитически неактивный белок Cas9, например dCas9, или его функциональный вариант или фрагмент. В некоторых вариантах осуществления dCas9 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 17:

DKKYSIGLAIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLFDSG
ETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFFHRLEESFLVEEDKKHER
HPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLALAHMIKFRGHFLIEGDLN
PDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSKSRRLENLIAQLPGEKKN
GLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLDNLLAQIGDQYADLFLAAK
NLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQS
KNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIH
LGELHAILRRQEDFYPFLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPW
NFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGM
RKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTY
HDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIEERLKTYAHLFDDKVMKQLKRR
RYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANRNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVS
GQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGILQTVKVVDELVKVMGRHKPENIVIEMARENQTTQKG
QKNSRERMKRIEEGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINR
LSDYDVAAIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKARGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAK
LITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLI
REVKVITLKSKLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNAVVGTALIKKYPKLESEFV
YGDYKVYDVRKMIAKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGET
GEIVWDKGRDFATVRKVLSMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDP
KKYGGFDSPTVAYSVLVVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIMERSSFEKNPIDFLEAKGY
KEVKKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLK
GSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVILADANLDKVLSAYNKHRDKPIREQA
ENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQSITGLYETRIDLSQLGGD
(SEQ ID NO: 17).

В некоторых вариантах осуществления dCas9 кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 50:

GACAAGAAGTACAGCATCGGCCTGGCCATCGGCACCAACAGCGTGGGCTGG
GCCGTGATCACCGACGAGTACAAGGTGCCCAGCAAGAAGTTCAAGGTGCTGGGCAA
CACCGACCGGCACAGCATCAAGAAGAACCTGATCGGCGCCCTGCTGTTCGACAGCG
GCGAGACCGCCGAGGCCACCCGGCTGAAGCGGACCGCCCGGCGGCGGTACACCCGG
CGGAAGAACCGGATCTGCTACCTGCAGGAGATCTTCAGCAACGAGATGGCCAAGGT
GGACGACAGCTTCTTCCACCGGCTGGAGGAGAGCTTCCTGGTGGAGGAGGACAAGA

AGCACGAGCGGCACCCCATCTTCGGCAACATCGTGGACGAGGTGGCCTACCACGAG
AAGTACCCCACCATCTACCACCTGCGGAAGAAGCTGGTGGACAGCACCGACAAGGC
CGACCTGCGGCTGATCTACCTGGCCCTGGCCCACATGATCAAGTTCCGGGGCCACTT
CCTGATCGAGGGCGACCTGAACCCCGACAACAGCGACGTGGACAAGCTGTTCATCC
AGCTGGTGCAGACCTACAACCAGCTGTTCGAGGAGAACCCCATCAACGCCAGCGGC
GTGGACGCCAAGGCCATCCTGAGCGCCCGGCTGAGCAAGAGCCGGCGGCTGGAGAA
CCTGATCGCCCAGCTGCCCGGCGAGAAGAAGAACGGCCTGTTCGGCAACCTGATCG
CCCTGAGCCTGGGCCTGACCCCCAACTTCAAGAGCAACTTCGACCTGGCCGAGGAC
GCCAAGCTGCAGCTGAGCAAGGACACCTACGACGACGACCTGGACAACCTGCTGGC
CCAGATCGGCGACCAGTACGCCGACCTGTTCCTGGCCGCCAAGAACCTGAGCGACG
CCATCCTGCTGAGCGACATCCTGCGGGTGAACACCGAGATCACCAAGGCCCCCCTG
AGCGCCAGCATGATCAAGCGGTACGACGAGCACCACCAGGACCTGACCCTGCTGAA
GGCCCTGGTGCGGCAGCAGCTGCCCGAGAAGTACAAGGAGATCTTCTTCGACCAGA
GCAAGAACGGCTACGCCGGCTACATCGACGGCGGCGCCAGCCAGGAGGAGTTCTAC
AAGTTCATCAAGCCCATCCTGGAGAAGATGGACGGCACCGAGGAGCTGCTGGTGAA
GCTGAACCGGGAGGACCTGCTGCGGAAGCAGCGGACCTTCGACAACGGCAGCATCC
CCCACCAGATCCACCTGGGCGAGCTGCACGCCATCCTGCGGCGGCAGGAGGACTTC
TACCCCTTCCTGAAGGACAACCGGGAGAAGATCGAGAAGATCCTGACCTTCCGGAT
CCCCTACTACGTGGGCCCCCTGGCCCGGGGCAACAGCCGGTTCGCCTGGATGACCCG
GAAATCCGAGGAGACCATCACCCCCTGGAACTTCGAGGAGGTGGTGGACAAGGGCG
CCAGCGCCCAGAGCTTCATCGAGCGGATGACCAACTTCGACAAGAACCTGCCCAAC
GAGAAGGTGCTGCCCAAGCACAGCCTGCTGTACGAGTACTTCACCGTGTACAACGA
GCTGACCAAGGTGAAGTACGTGACCGAGGGCATGCGGAAGCCCGCCTTCCTGAGCG
GCGAGCAGAAGAAGGCCATCGTGGACCTGCTGTTCAAGACCAACCGGAAGGTGACC
GTGAAGCAGCTGAAGGAGGACTACTTCAAGAAGATCGAGTGCTTCGACAGCGTGGA
GATCAGCGGCGTGGAGGACCGGTTCAACGCCAGCCTGGGCACCTACCACGACCTGC
TGAAGATCATCAAGGACAAGGACTTCCTGGACAACGAGGAGAACGAGGACATCCTG
GAGGACATCGTGCTGACCCTGACCCTGTTCGAGGACCGGGAGATGATCGAGGAGCG
GCTGAAAACCTACGCCCACCTGTTCGACGACAAGGTGATGAAGCAGCTGAAGCGGC
GGCGGTACACCGGCTGGGGCCGGCTGAGCCGGAAGCTGATCAACGGCATCCGGGAC
AAGCAGAGCGGCAAGACCATCCTGGACTTCCTGAAATCCGACGGCTTCGCCAACCG
GAACTTCATGCAGCTGATCCACGACGACAGCCTGACCTTCAAGGAGGACATCCAGA
AGGCCCAGGTGAGCGGCCAGGGCGACAGCCTGCACGAGCACATCGCCAACCTGGCC
GGCAGCCCCGCCATCAAGAAGGGCATCCTGCAGACCGTGAAGGTGGTGGACGAGCT
GGTGAAGGTGATGGGCCGGCACAAGCCCGAGAACATCGTGATCGAGATGGCCCGGG
AGAACCAGACCACCCAGAAGGGCCAGAAGAACAGCCGGGAGCGGATGAAGCGGAT
CGAGGAGGGCATCAAGGAGCTGGGCAGCCAGATCCTGAAGGAGCACCCCGTGGAG
AACACCCAGCTGCAGAACGAGAAGCTGTACCTGTACTACCTGCAGAACGGCCGGGA
CATGTACGTGGACCAGGAGCTGGACATCAACCGGCTGAGCGACTACGACGTGGCCG
CCATCGTGCCCCAGAGCTTCCTGAAGGACGACAGCATCGACAACAAGGTGCTGACC

CGGAGCGACAAGGCCCGGGGCAAGAGCGACAACGTGCCCAGCGAGGAGGTGGTGA
AGAAGATGAAGAACTACTGGCGGCAGCTGCTGAACGCCAAGCTGATCACCCAGCGG
AAGTTCGACAACCTGACCAAGGCCGAGCGGGGCGGCCTGAGCGAGCTGGACAAGG
CCGGCTTCATCAAGCGGCAGCTGGTGGAGACCCGGCAGATCACCAAGCACGTGGCC
CAGATCCTGGACAGCCGGATGAACACCAAGTACGACGAGAACGACAAGCTGATCCG
GGAGGTGAAGGTGATCACCCTGAAATCCAAGCTGGTGAGCGACTTCCGGAAGGACT
TCCAGTTCTACAAGGTGCGGGAGATCAACAACTACCACCACGCCCACGACGCCTAC
CTGAACGCCGTGGTGGGCACCGCCCTGATCAAGAAGTACCCCAAGCTGGAGAGCGA
GTTCGTGTACGGCGACTACAAGGTGTACGACGTGCGGAAGATGATCGCCAAGAGCG
AGCAGGAGATCGGCAAGGCCACCGCCAAGTACTTCTTCTACAGCAACATCATGAAC
TTCTTCAAGACCGAGATCACCCTGGCCAACGGCGAGATCCGGAAGCGGCCCCTGAT
CGAGACCAACGGCGAGACCGGCGAGATCGTGTGGGACAAGGGCCGGGACTTCGCC
ACCGTGCGGAAGGTGCTGAGCATGCCCCAGGTGAACATCGTGAAGAAAACCGAGGT
GCAGACCGGCGGCTTCAGCAAGGAGAGCATCCTGCCCAAGCGGAACAGCGACAAG
CTGATCGCCCGGAAGAAGGACTGGGACCCCAAGAAGTACGGCGGCTTCGACAGCCC
CACCGTGGCCTACAGCGTGCTGGTGGTGGCCAAGGTGGAGAAGGGCAAGAGCAAG
AAGCTGAAATCCGTGAAGGAGCTGCTGGGCATCACCATCATGGAGCGGAGCAGCTT
CGAGAAGAACCCCATCGACTTCCTGGAGGCCAAGGGCTACAAGGAGGTGAAGAAG
GACCTGATCATCAAGCTGCCCAAGTACAGCCTGTTCGAGCTGGAGAACGGCCGGAA
GCGGATGCTGGCCAGCGCCGGCGAGCTGCAGAAGGGCAACGAGCTGGCCCTGCCCA
GCAAGTACGTGAACTTCCTGTACCTGGCCAGCCACTACGAGAAGCTGAAGGGCAGC
CCCGAGGACAACGAGCAGAAGCAGCTGTTCGTGGAGCAGCACAAGCACTACCTGGA
CGAGATCATCGAGCAGATCAGCGAGTTCAGCAAGCGGGTGATCCTGGCCGACGCCA
ACCTGGACAAGGTGCTGAGCGCCTACAACAAGCACCGGGACAAGCCCATCCGGGAG
CAGGCCGAGAACATCATCCACCTGTTCACCCTGACCAACCTGGGCGCCCCCGCCGCC
TTCAAGTACTTCGACACCACCATCGACCGGAAGCGGTACACCAGCACCAAGGAGGT
GCTGGACGCCACCCTGATCCACCAGAGCATCACCGGCCTGTACGAGACCCGGATCG
ACCTGAGCCAGCTGGGCGGCGAC (SEQ ID NO: 50).

В некоторых вариантах осуществления нацеливающаяся функциональная группа может предусматривать домен Cas, содержащий gRNA или связанный (например, ковалентно) с ней. gRNA представляет собой короткую синтетическую РНК, состоящую из "каркасной" последовательности, необходимой для связывания Cas-белка, и определяемой пользователем целенаправленно воздействующей последовательности из ~20 нуклеотидов для геномной мишени. На практике последовательности направляющих РНК, как правило, разрабатывают таким образом, чтобы они имели длину 17-24 нуклеотида (например, 19, 20 или 21 нуклеотид) и были комплементарными целевой последовательности нуклеиновой кислоты. Специализированные генераторы и алгоритмы для создания gRNA являются коммерчески доступными для применения в конструировании эффективных направляющих РНК. Редактирование генов также осуществляли с помощью химерных "одиночных направляющих РНК" ("sgRNA"),

сконструированной (синтетической) одиночной молекулы РНК, которая имитирует встречающийся в природе комплекс crRNA-tracrRNA и содержит как tracrRNA (для связывания с нуклеазой), так и по меньшей мере одну crRNA (для направления нуклеазы к целевой последовательности для редактирования). Также было продемонстрировано, что химически модифицированные sgRNA являются эффективными для использования с белками Cas; см., например, Hendel et al. (2015) Nature Biotechnol., 985-991. Иллюстративные последовательности направляющей РНК раскрыты в таблице 2 и таблице 13.

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

В некоторых вариантах осуществления gRNA для применения с доменом CRISPR/Cas специфически связывает последовательность-мишень, ассоциированную с CTCF. В некоторых вариантах осуществления gRNA для применения с доменом CRISPR/Cas специфически связывает последовательность-мишень, ассоциированную с промотором. В некоторых вариантах осуществления gRNA связывается с последовательностью-мишенью, перечисленной в таблице 2 или таблице 13. В некоторых вариантах осуществления репрессор экспрессии, описанный в данном документе, связывается с последовательностью-мишенью, перечисленной в таблице 2 или таблице 13.

Таблица 2. Иллюстративные последовательности gRNA

| Название направляющей | Сайт-мишень | Последовательность-мишень | Координаты в геноме | Нить |
|---|---|---|---|---|
| GD-28616 | CTCF | ATGATCTCTGCTGCCAGTAG (SEQ ID NO: 1) | chr8:128746342-128746364 | + |
| GD-28859 | CTCF | ATCGCGCCTGGATGTCAACG (SEQ ID NO: 2) | chr8:128746321-128746343 | - |
| GD-28862 | CTCF | ATTGTGCAGTGCATCGGATT (SEQ ID NO: 3) | chr8:128746525-128746547 | + |
| GD-28617 | Промотор | GTCAAACAGTACTGCTACGG (SEQ ID NO: 4) | chr8:128748014-128748036 | + |

Таблица 13. Иллюстративные последовательности gRNA

| **Название направляющей** | **Последовательность-мишень** | **Координаты в геноме** |
|---|---|---|
| GD-29833 | TGCCACTTCCCCACTAACCC (SEQ ID NO: 96) | GRCh37: chr8:129188878-129188900 |
| GD-29834 | GGCCACACAAGGAAGCTGCA (SEQ ID NO: 97) | GRCh37: chr8:129188958-129188980 |
| GD-29835 | CCACACAAGGAAGCTGCAGG (SEQ ID NO: 98) | GRCh37: chr8:129188960-129188982 |
| GD-29836 | TGATTGGAATGCAACCCGAA (SEQ ID NO: 99) | GRCh37: chr8:129189067-129189089 |
| GD-29837 | TTTTGCCCTTGCTACCCCAA (SEQ ID NO: 100) | GRCh37: chr8:129189457-129189479 |
| GD-29838 | AGCTGATGGTATCCACTAGG (SEQ ID NO: 101) | GRCh37: chr8:129189554-129189576 |
| GD-29839 | CACATCCAAGAATGTAGTGG (SEQ ID NO: 102) | GRCh37: chr8:129189679-129189701 |
| GD-29840 | GATACAGCCACAAAGCTCAC (SEQ ID NO: 103) | GRCh37: chr8:129209511-129209533 |
| GD-29841 | ATTACATAACAGAATCCAGG (SEQ ID NO: 104) | GRCh37: chr8:129209643-129209665 |
| GD-29842 | CCCTTGACTGTGCTGCCACC (SEQ ID NO: 105) | GRCh37: chr8:129209658-129209680 |
| GD-29843 | CAGACGAGGAACCTGAACCC (SEQ ID NO: 106) | GRCh37: chr8:129209856-129209878 |
| GD-29844 | AGAATCCCTTGGGGTAGCAA (SEQ ID NO: 107) | GRCh37: chr8:129189452-129189474 |
| GD-29914 | CAGCACTCTCGCTGACCGCA (SEQ ID NO: 108) | GRCh37: chr8:129189190-129189212 |
| GD-29915 | GTTGAGTCATGTGTACTCTG (SEQ ID NO: 109) | GRCh37: chr8:129189274-129189296 |
| GD-29916 | AGGAACAGGATGTTACAACT (SEQ ID NO: 110) | GRCh37: chr8:129189421-129189443 |
| GD-28662 | GGGGCCACTAGGGACAGGAT (SEQ ID NO: 111) | GRCh37: chr19:55627120-55627139 |

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

Эффекторные домены TAL

В некоторых вариантах осуществления функциональная группа, нацеливающаяся на ДНК, представляет собой или предусматривает эффекторный домен TAL. Эффекторный домен TAL, например эффекторный домен TAL, который специфически связывается с последовательностью ДНК, содержит множество эффекторных повторов TAL или их фрагментов и необязательно одну или несколько дополнительных частей встречающихся в природе эффекторных повторов TAL (например, N- и/или C-концевая часть множества эффекторных доменов TAL), где каждый эффекторный повтор TAL распознает нуклеотид. Эффекторный белок TAL может содержать эффекторный домен TAL и необязательно один или несколько других доменов. Многие эффекторные домены TAL известны специалистам в данной области и коммерчески доступны, например, от Thermo Fisher Scientific.

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

Представители семейства эффекторов TAL различаются в основном количеством и порядком своих повторов. Количество повторов находится в диапазоне от 1,5 до 33,5 повтора, и при этом C-концевой повтор обычно короче по длине (например, приблизительно 20 аминокислот) и, как правило, называется "полуповтором". Каждый повтор эффектора TAL характеризуется корреляцией "один повтор - одна пара оснований", при этом разные типы повторов демонстрируют разную специфичность в

отношении пары оснований (один повтор распознает одну пару оснований в последовательности гена-мишени). Как правило, чем меньше количество повторов, тем слабее взаимодействия белок-ДНК. Было показано, что количество 6,5 повтора достаточно для активации транскрипции репортерного гена (Scholze et al., 2010).

Вариации от повтора к повтору происходят преимущественно в положениях аминокислот 12 и 13, которые поэтому были названы "гипервариабельными" и которые отвечают за специфичность взаимодействия с последовательностью промотора ДНК-мишенью, которая показана в таблице 3, в которой указаны иллюстративные вариабельные диостатки повторов (RVD) и их соответствие основаниям нуклеиновых кислот-мишеням.

Таблица 3. RVD и специфичность в отношении оснований нуклеиновых кислот

| Мишень | Возможные комбинации аминокислот RVD | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| A | NI | NN | CI | HI | KI | | | | | | | | |
| G | NN | GN | SN | VN | LN | DN | QN | EN | HN | RH | NK | AN | FN |
| C | HD | RD | KD | ND | AD | | | | | | | | |
| T | NG | HG | VG | IG | EG | MG | YG | AA | EP | VA | QG | KG | RG |

Соответственно, можно модифицировать повторы эффектора TAL для целенаправленного воздействия на определенные последовательности ДНК. Дополнительные исследования показали, что RVD NK может целенаправленно воздействовать на G. Сайты-мишени эффекторов TAL также, как правило, содержат T, фланкирующий целевое 5'-основание для первого повтора, но точный механизм этого распознавания неизвестен. На сегодняшний день известно более 113 эффекторных последовательностей TAL. Неограничивающие примеры эффекторов TAL из Xanthomonas включают Hax2, Hax3, Hax4, AvrXa7, AvrXa10 и AvrBs3.

Соответственно, эффекторный повтор TAL эффекторного домена TAL по настоящему изобретению может быть получен из эффектора TAL любого вида бактерий (например, Xanthomonas, таких как африканский штамм Xanthomonas oryzae pv. Oryzae (Yu et al. 2011), штамм 756C Xanthomonas campestris pv. raphani и штамм BLS256 Xanthomonas oryzae pv. Oryzicola (Bogdanove et al. 2011). Как используется в данном документе, эффекторный домен TAL в соответствии с настоящим изобретением содержит домен RVD, а также фланкирующую(-ие) последовательность(-и) (последовательности на N-концевой и/или C-концевой стороне домена RVD), также из встречающегося в природе эффектора TAL. Он может содержать больше или меньше повторов, чем RVD встречающегося в природе эффекторного домена TAL. Эффекторный домен TAL по настоящему изобретению разработан для нацеливания на данную последовательность ДНК на основе приведенного выше кода и других кодов, известных из уровня техники. Количество эффекторных повторов TAL (например, мономеров или модулей) и их конкретную последовательность выбирают на основе требуемой последовательности ДНК-мишени. Например, эффекторные повторы TAL могут быть удалены или добавлены,

чтобы соответствовать специфической последовательности-мишени. В одном варианте осуществления эффекторный домен TAL по настоящему изобретению содержит от 6,5 до 33,5 эффекторного повтора TAL. В одном варианте осуществления эффекторный домен TAL по настоящему изобретению содержит от 8 до 33,5 эффекторного повтора TAL, например от 10 до 25 эффекторных повторов TAL, например от 10 до 14 эффекторных повторов TAL.

В некоторых вариантах осуществления эффекторный домен TAL содержит эффекторные повторы TAL, которые соответствуют последовательности ДНК-мишени до абсолютного совпадения. В некоторых вариантах осуществления допускается несовпадение между повтором и парой оснований-мишеней в последовательности ДНК-мишени, если это позволяет осуществлять функцию системы репрессии экспрессии, например репрессора экспрессии, содержащей эффекторный домен TAL. Как правило, связывание TALE обратно коррелирует с количеством ошибок спаривания. В некоторых вариантах осуществления эффекторный домен TAL репрессора экспрессии по настоящему изобретению содержит не более чем 7 ошибок спаривания, 6 ошибок спаривания, 5 ошибок спаривания, 4 ошибки спаривания, 3 ошибки спаривания, 2 ошибки спаривания или 1 ошибку спаривания и необязательно не содержит ошибок спаривания с последовательностью-мишенью ДНК. Без ограничения какой-либо теорией, как правило, чем меньше число эффекторных повторов TAL в эффекторном домене TAL, тем меньшее число ошибок спаривания будет допустимо и все еще будет позволять осуществлять функцию системы репрессии экспрессии, например репрессора экспрессии, содержащей эффекторный домен TAL. Считается, что аффинность связывания зависит от суммы совпадающих комбинаций повтор-ДНК. Например, эффекторные домены TAL, имеющие 25 или больше эффекторных повторов TAL, могут допускать до 7 ошибок спаривания.

В дополнение к эффекторным повторам TAL, эффекторный домен TAL по настоящему изобретению может содержать дополнительные последовательности, полученные из встречающегося в природе эффектора TAL. Длина С-концевой и/или N-концевой последовательности(-ей), включенной(-ых) с каждой стороны от части, представляющей собой эффекторный повтор TAL эффекторного домена TAL, может варьировать и может быть выбрана специалистом в данной области, например на основании исследований Zhang et al. (2011). Zhang et al. охарактеризовали ряд усеченных на С-конце и N-конце мутантных форм в белках на основе TAL-эффекторов, полученных из Hax3, и идентифицировали ключевые элементы, которые способствуют оптимальному связыванию с последовательностью-мишенью и, таким образом, активации транскрипции. В целом было обнаружено, что транскрипционная активность обратно коррелирует с длиной N-конца. Что касается С-конца, был идентифицирован важный элемент из ДНК-связывающих остатков в пределах первых 68 аминокислот последовательности Hax 3. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления первые 68 аминокислот на С-концевой стороне эффекторных повторов TAL встречающегося в природе эффектора TAL включены в эффекторный домен TAL репрессора экспрессии по настоящему

изобретению. Соответственно, в одном варианте осуществления эффекторный домен TAL по настоящему изобретению содержит 1) один или несколько эффекторных повторов TAL, полученных из встречающегося в природе эффектора TAL; 2) по меньшей мере 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 170, 180, 190, 200, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280 или больше аминокислот из встречающегося в природе эффектора TAL с N-концевой стороны от эффекторных повторов TAL и/или 3) по меньшей мере 68, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 170, 180, 190, 200, 220, 230, 240, 250, 260 или больше аминокислот из встречающегося в природе эффектора TAL с C-концевой стороны от эффекторных повторов TAL.

В некоторых вариантах осуществления модулирующее средство содержит нацеливающуюся функциональную группу, содержащую сконструированный ДНК-связывающий домен (DBD), например эффектор TAL, содержащий эффекторный повтор TAL, который связывается с последовательностью-мишенью, например последовательностью промотора или сайта начала транскрипции (TSS)), функционально связанной с геном-мишенью (например, MYC), например последовательностью, проксимальной по отношению к регуляторному элементу транскрипции, например якорной последовательностью объединения, опосредованного якорной последовательностью (ASMC), содержащего ген-мишень (например, MYC), например последовательностью, проксимальной по отношению к якорной последовательности. В некоторых вариантах осуществления эффекторный домен TAL может быть сконструирован так, чтобы нести эпигенетические эффекторные функциональные группы к сайтам-мишеням.

Домены по типу "Zn-пальцев"

В некоторых вариантах осуществления функциональная группа, нацеливающаяся на ДНК, представляет собой или предусматривает домен по типу "Zn-пальца". Домен по типу "Zn-пальца" предусматривает "Zn-пальцы", например встречающийся в природе "Zn-палец", или сконструированный "Zn-палец", или его фрагмент. Многие "Zn-пальцы" известны специалистам в данной области и коммерчески доступны, например, от Sigma-Aldrich. Как правило, домен по типу "Zn-пальца" содержит множество "Zn-пальцев", при этом каждый "Zn-палец" распознает три нуклеотида. Белок с "Zn-пальцем" может содержать эффекторный домен по типу "Zn-пальца" и необязательно один или несколько других доменов.

В некоторых вариантах осуществления молекула с "Zn-пальцами" содержит не встречающийся в природе белок с "Zn-пальцами", который сконструирован таким образом, что он связывается с выбранной последовательностью ДНК-мишени. См., например, Beerli, et al. (2002) Nature Biotechnol. 20:135-141; Pabo, et al. (2001) Ann. Rev. Biochem. 70:313-340; Isalan, et al. (2001) Nature Biotechnol. 19:656-660; Segal, et al. (2001) Curr. Opin. Biotechnol. 12:632-637; Choo, et al. (2000) Curr. Opin. Struct. Biol. 10:411-416; патенты США №№ 6453242; 6534261; 6599692; 6503717; 6689558; 7030215; 6794136; 7067317; 7262054; 7070934; 7361635; 7253273; и публикации заявок на патент США №№

2005/0064474; 2007/0218528; 2005/0267061, все из которых включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

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

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

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

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

В определенных вариантах осуществления функциональная группа, нацеливающаяся на ДНК, содержит домен по типу "Zn-пальца", содержащий сконструированный "цинковый палец", который связывается (специфичным для последовательности образом) с последовательностью ДНК-мишенью. В некоторых вариантах осуществления домен по типу "Zn-пальца" содержит один "Zn-палец" или его

фрагмент. В некоторых вариантах осуществления домен по типу "Zn-пальца" содержит множество "Zn-пальцев" (или их фрагментов), например 2, 3, 4, 5, 6 или больше "Zn-пальцев" (и необязательно не более 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3 или 2 "Zn-пальцев"). В некоторых вариантах осуществления домен по типу "Zn-пальца" содержит по меньшей мере три "Zn-пальца". В некоторых вариантах осуществления домен по типу "Zn-пальца" содержит четыре, пять или шесть "Zn-пальцев". В некоторых вариантах осуществления домен по типу "Zn-пальца" содержит 8, 9, 10, 11 или 12 "Zn-пальцев". В некоторых вариантах осуществления домен по типу "Zn-пальца", содержащий три "Zn-пальца", распознает последовательность ДНК-мишень, содержащую 9 или 10 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления домен по типу "Zn-пальца", содержащий четыре "Zn-пальца", распознает последовательность ДНК-мишень, содержащую 12-14 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления домен по типу "Zn-пальца", содержащий шесть "Zn-пальцев", распознает последовательность ДНК-мишень, содержащую 18-21 нуклеотид.

В некоторых вариантах осуществления нацеливающийся домен содержит двурукий белок с "Zn-пальцами". Двурукие белки с "цинковыми пальцами" представляют собой белки, в которых два кластера "цинковых пальцев" разделены промежуточными аминокислотами, так что два домена по типу "цинкового пальца" связываются с двумя прерывистыми последовательностями ДНК-мишенями. Примером двурукого типа связывающего белка с "цинковыми пальцами" является SIP1, где кластер из четырех "цинковых пальцев" расположен на аминоконце белка, а кластер из трех "Zn-пальцев" расположен на карбоксильном конце (см. Remade, et al. (1999) EMBO Journal 18(18):5073-5084). Каждый кластер "цинковых пальцев" в этих доменах способен связываться с уникальной последовательностью-мишенью, а расстояние между двумя последовательностями-мишенями может составлять множество нуклеотидов.

В некоторых вариантах осуществления репрессор экспрессии содержит нацеливающуюся функциональную группу, содержащую сконструированный ДНК-связывающий домен (DBD), например домен по типу "Zn-пальца", содержащий "Zn-палец" (ZFN), который связывается с последовательностью-мишенью, например последовательностью промотора или сайта начала транскрипции (TSS)), функционально связанной с геном-мишенью (например, MYC), например последовательностью, проксимальной по отношению к регуляторному элементу транскрипции, например якорной последовательностью объединения, опосредованного якорной последовательностью (ASMC), содержащего ген-мишень (например, MYC), например последовательностью, проксимальной по отношению к якорной последовательности. В некоторых вариантах осуществления ZFN может быть сконструирован так, чтобы нести эпигенетические эффекторные молекулы к сайтам-мишеням. В некоторых вариантах осуществления нацеливающаяся функциональная группа содержит домен по типу "Zn-пальца", который содержит 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 "цинковых пальцев". Аминокислотные последовательности иллюстративных нацеливающихся функциональных групп, раскрытых в данном документе, перечислены в таблице 4. Нуклеотидные

последовательности, кодирующие иллюстративные нацеливающиеся функциональные группы, раскрытые в данном документе, перечислены в таблице 5. В некоторых вариантах осуществления репрессор экспрессии или система, описанные в данном документе, содержат нацеливающуюся функциональную группу, содержащую последовательность, изложенную в таблице 4, или последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентичностью с ней. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота, описанная в данном документе, содержит последовательность, изложенную в таблице 5, или последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентичностью с ней.

Таблица 4. Аминокислотные последовательности иллюстративных нацеливающихся функциональных групп

| Название | SEQ ID NO: | ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ |
|---|---|---|
| ZF1 (а. к.) | 5 | LEPGEKPYKCPECGKSFSRSDKLTEHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSTKNSLTEHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQSGDLRRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSTTGALTEHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSDSGNLRVHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQRAHLERHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSTSGELVRHQRTHTGEKPTGKKTS |
| ZF2 (а. к.) | 6 | LEPGEKPYKCPECGKSFSSPADLTRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSDPGHLVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSRSDNLVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQSSSLVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSTSHSLTEHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSRNDALTEHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSRNDALTEHQRTHTGEKPTGKKTS |
| ZF3 (а. к.) | 7 | LEPGEKPYKCPECGKSFSRSDKLVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQRAHLERHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSDPGHLVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSRSDKLVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQLAHLRAHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSRADNLTEHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSDCRDLARHQRTHTGEKPTGKKTS |
| ZF4 (а. к.) | 8 | LEPGEKPYKCPECGKSFSHTGHLLEHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSTTGNLTVHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSDKKDLTRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQSGDLRRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQRAHLERHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSRSDKLTEHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSRTDTLRDHQRTHTGEKPTGKKTS |

| | | |
|---|---|---|
| ZF5 (а. к.) | 9 | LEPGEKPYKCPECGKSFSHTGHLLEHQRTHTGEKPYKCPECGKSFS TSGNLTEHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSTSGNLVRHQRTHTGEKPY KCPECGKSFSQLAHLRAHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSERSHLREH QRTHTGEKPYKCPECGKSFSDPGHLVRHQRTHTGEKPYKCPECGKS FSTHLDLIRHQRTHTGEKPTGKKTS |
| ZF6 (а. к.) | 10 | LEPGEKPYKCPECGKSFSDPGALVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFS ERSHLREHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSRSDHLTNHQRTHTGEKPY KCPECGKSFSERSHLREHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSRSDHLTNH QRTHTGEKPYKCPECGKSFSDPGHLVRHQRTHTGEKPYKCPECGK SFSRSDKLVRHQRTHTGEKPTGKKTS |
| ZF7 (а. к.) | 11 | LEPGEKPYKCPECGKSFSRNDALTEHQRTHTGEKPYKCPECGKSFS DCRDLARHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSDPGHLVRHQRTHTGEKP YKCPECGKSFSQSGHLTEHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSREDNLHT HQRTHTGEKPYKCPECGKSFSTKNSLTEHQRTHTGEKPYKCPECGK SFSRADNLTEHQRTHTGEKPTGKKTS |
| ZF8 (а. к.) | 12 | LEPGEKPYKCPECGKSFSRSDKLTEHQRTHTGEKPYKCPECGKSFS RRDELNVHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSRSDHLTNHQRTHTGEKP YKCPECGKSFSSPADLTRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSRSDHLTN HQRTHTGEKPYKCPECGKSFSSKKALTEHQRTHTGEKPYKCPECG KSFSTHLDLIRHQRTHTGEKPTGKKTS |
| ZF9 (а. к.) | 13 | LEPGEKPYKCPECGKSFSRSDDLVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFS REDNLHTHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSRSDHLTTHQRTHTGEKP YKCPECGKSFSQRANLRAHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQLAHLR AHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQRANLRAHQRTHTGEKPYKCPEC GKSFSERSHLREHQRTHTGEKPTGKKTS |
| ZF10 (а. к.) | 14 | LEPGEKPYKCPECGKSFSQSGDLRRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFS QSGHLTEHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSERSHLREHQRTHTGEKPY KCPECGKSFSDPGHLVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSRNDTLTEH QRTHTGEKPYKCPECGKSFSRADNLTEHQRTHTGEKPYKCPECGKS FSTHLDLIRHQRTHTGEKPTGKKTS |
| ZF11 (а. к.) | 15 | LEPGEKPYKCPECGKSFSHTGHLLEHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSS KKALTEHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSDCRDLARHQRTHTGEKPYK CPECGKSFSHTGHLLEHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSRNDALTEHQR THTGEKPYKCPECGKSFSQSGDLRRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSD SGNLRVHQRTHTGEKPTGKKTS |

| | | |
|---|---|---|
| ZF12 (а. к.) | 16 | LEPGEKPYKCPECGKSFSQSSSLVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSR SDHLTNHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQLAHLRAHQRTHTGEKPY KCPECGKSFSQSSNLVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSRSDNLVRH QRTHTGEKPYKCPECGKSFSRSDELVRHQRTHTGEKPYKCPECGKS FSQLAHLRAHQRTHTGEKPTGKKTS |
| ZF54 (а. к.) | 169 | LEPGEKPYKCPECGKSFSERSHLREHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSR SDNLVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSDCRDLARHQRTHTGEKPY KCPECGKSFSTSGELVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSTTGNLTVH QRTHTGEKPYKCPECGKSFSRSDKLVRHQRTHTGEKPYKCPECGKS FSRTDTLRDHQRTHTGKKTS |
| ZF61 (а. к.) | 170 | LEPGEKPYKCPECGKSFSQKSSLIAHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSH KNALQNHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQSSNLVRHQRTHTGEKPY KCPECGKSFSRNDALTEHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSDKKDLTRH QRTHTGEKPYKCPECGKSFSQAGHLASHQRTHTGEKPYKCPECGKS FSDKKDLTRHQRTHTGKKTS |
| ZF67 (а. к.) | 171 | LEPGEKPYKCPECGKSFSRSDNLVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFS DCRDLARHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSTSGELVRHQRTHTGEKPY KCPECGKSFSTTGNLTVHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSRSDKLVRH QRTHTGEKPYKCPECGKSFSRTDTLRDHQRTHTGEKPYKCPECGKS FSREDNLHTHQRTHTGKKTS |
| ZF68 (а. к.) | 172 | LEPGEKPYKCPECGKSFSRSDHLTTHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQ KSSLIAHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSRRDELNVHQRTHTGEKPYK CPECGKSFSQSGDLRRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQAGHLASHQ RTHTGEKPYKCPECGKSFSTSGNLTEHQRTHTGEKPYKCPECGKSFS QAGHLASHQRTHTGKKTS |

Таблица 5. Нуклеотидные последовательности иллюстративных нацеливающихся функциональных групп

| Название | SEQ ID NO: | ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ |
|---|---|---|
| ZF1 (нт) | 38 | CTGGAGCCCGGCGAGAAACCCTACAAGTGCCCCGAGTGCGG CAAATCCTTCTCTAGAAGCGACAAACTGAC CGAACATCAGAGGACCCACACCGGCGAGAAGCCTTATAAGT GTCCCGAATGCGGCAAATCCTTCAGCACCA AGAACTCTCTGACAGAACACCAGAGAACACATACCGGAGAG AAACCTTATAAATGCCCCGAGTGCGGCAAG |

| | | |
|---|---|---|
| | | TCCTTCTCCCAGTCCGGCGATCTGAGGAGACACCAAAGAACA<br>CATACCGGCGAAAAGCCTTACAAGTGCCC<br>CGAGTGTGGAAAGAGCTTCTCCACCACCGGCGCTCTGACCGA<br>GCACCAGAGAACACACACCGGCGAGAAAC<br>CCTATAAATGTCCCGAGTGTGGCAAATCCTTCAGCGACAGCG<br>GCAATCTGAGAGTGCACCAAAGAACCCAT<br>ACCGGCGAAAAACCCTACAAATGCCCCGAGTGCGGCAAATC<br>CTTCAGCCAGAGGGCCCATCTGGAGAGGCA<br>CCAAAGGACACACACCGGAGAAAAGCCCTACAAGTGTCCCG<br>AGTGTGGAAAAAGCTTTAGCACAAGCGGCGAGCTGGTGAGG<br>CATCAAAGGACCCACACCGGCGAAAAGCCCACCGGCAAAAA<br>GACCAGC |
| ZF2<br>(нт) | 39 | CTGGAGCCCGGCGAGAAGCCCTACAAGTGCCCCGAGTGCGG<br>AAAGTCCTTCAGCTCCCCCGCCGATCTGAC<br>AAGACATCAGAGAACCCATACCGGCGAGAAACCTTACAAAT<br>GCCCCGAATGTGGCAAGTCCTTTAGCGATC<br>CCGGACATCTGGTGAGGCACCAGAGGACACACACCGGCGAA<br>AAGCCCTATAAATGTCCCGAGTGTGGAAAG<br>AGCTTTTCTAGAAGCGACAATCTCGTGAGACACCAGAGAACC<br>CACACCGGAGAGAAGCCTTACAAGTGCCC<br>CGAGTGCGGCAAATCCTTCAGCCAGAGCTCCTCTCTGGTGAG<br>GCACCAAAGGACCCACACCGGCGAGAAAC<br>CTTATAAGTGTCCCGAGTGTGGCAAAAGCTTCAGCACCTCCC<br>ACTCTCTGACCGAGCATCAAAGAACCCACA<br>CCGGCGAAAAACCTTATAAATGCCCCGAGTGTGGCAAATCCT<br>TCAGCAGAAATGACGCTCTGACAGAGCAC<br>CAAAGAACACATACCGGAGAAAAGCCCTACAAATGCCCCGA<br>GTGTGGAAAATCCTTTTCTAGAAACGATGCTCTGACCGAACA<br>CCAAAGAACACACACCGGCGAAAAGCCTACCGGAAAAAAGA<br>CCAGC |

| | | |
|---|---|---|
| ZF3 (нт) | 40 | CTGGAGCCCGGCGAAAAACCTTACAAGTGCCCCGAGTGCGG<br>AAAGAGCTTCAGCAGAAGCGACAAACTGGTGAGGCATCAAA<br>GGACACATACCGGAGAGAAGCCCTATAAGTGCCCCGAATGT<br>GGCAAATCCTTTTCCCAGAGGGCTCATCTGGAAAGACACCAG<br>AGGACCCATACCGGCGAAAAACCCTACAAATGTCCCGAGTG<br>TGGAAAGAGCTTTTCCGATCCCGGCCATCTGGTCAGACATCA<br>GAGGACACATACCGGCGAAAAGCCTTACAAGTGTCCCGAAT<br>GCGGAAAATCCTTCTCCAGAAGCGACAAGCTGGTGAGGCAC<br>CAAAGAACCCACACCGGCGAAAAACCCTATAAATGCCCCGA<br>GTGCGGCAAGTCCTTTAGCCAGCTGGCCCATCTGAGAGCCCA<br>CCAGAGAACACACACCGGAGAGAAGCCTTATAAGTGTCCCG<br>AGTGCGGAAAGTCCTTCTCTAGAGCCGACAATCTGACCGAAC<br>ATCAAAGGACACACACCGGCGAGAAACCTTATAAATGCCCC<br>GAGTGCGGAAAAAGCTTTTCCGACTGCAGAGATCTGGCTAGA<br>CACCAGAGAACCCACACCGGCGAGAAACCCACCGGCAAAAA<br>GACCAGC |
| ZF4 (нт) | 41 | CTGGAGCCCGGCGAAAAGCCTTATAAATGTCCCGAATGCGGC<br>AAGAGCTTTAGCCACACCGGCCATCTGCT<br>GGAACACCAAAGGACCCATACCGGCGAAAAGCCCTATAAGT<br>GCCCCGAGTGTGGCAAGAGCTTCAGCACCA<br>CCGGCAATCTGACAGTCCATCAGAGGACCCACACCGGAGAG<br>AAACCCTATAAATGCCCCGAGTGTGGAAAG<br>TCCTTCTCCGACAAGAAGGATCTGACAAGACACCAGAGGAC<br>CCATACCGGCGAGAAACCCTACAAATGCCC<br>CGAGTGCGGCAAATCCTTCTCCCAGAGCGGCGATCTGAGGAG<br>ACATCAAAGAACACATACCGGCGAAAAAC<br>CCTATAAGTGCCCCGAATGCGGCAAGTCCTTCAGCCAGAGGG<br>CCCATCTGGAAAGGCATCAGAGGACACAC<br>ACCGGCGAGAAGCCTTACAAATGTCCCGAGTGCGGAAAGAG<br>CTTCTCTAGAAGCGACAAGCTGACCGAGCA<br>TCAGAGGACCCACACCGGAGAAAAACCTTACAAGTGCCCCG<br>AGTGCGGCAAAAGCTTCAGCAGAACCGACACACTGAGAGAT<br>CACCAAAGGACACACACCGGCGAGAAACCCACCGGCAAAAA<br>GACCAGC |

| | | |
|---|---|---|
| ZF5 (нт) | 42 | CTGGAGCCCGGCGAGAAGCCTTATAAGTGCCCCGAGTGTGGC<br>AAGAGCTTTAGCCACACCGGCCATCTGCTGGAGCATCAAAGG<br>ACACACACCGGAGAAAAGCCCTATAAGTGCCCCGAGTGTGG<br>CAAATCCTTCAGCACCTCCGGCAATCTCACCGAACACCAGAG<br>AACACACACCGGAGAAAAACCTTACAAATGTCCCGAGTGTG<br>GAAAGAGCTTTTCCACCAGCGGCAATCTGGTGAGACATCAAA<br>GAACACATACCGGCGAAAAACCCTATAAATGCCCCGAGTGT<br>GGAAAATCCTTCTCCCAACTGGCCCATCTGAGGGCCCACCAG<br>AGGACACATACCGGAGAAAAACCCTACAAATGCCCCGAATG<br>CGGAAAAAGCTTCTCCGAGAGAAGCCATCTGAGAGAGCACC<br>AAAGGACCCATACCGGAGAAAAGCCTTACAAGTGTCCCGAG<br>TGCGGAAAAAGCTTTAGCGATCCCGGACATCTGGTGAGACAT<br>CAGAGAACCCACACCGGCGAAAAGCCTTATAAATGTCCCGA<br>ATGTGGCAAGTCCTTTAGCACCCATCTGGATCTGATTAGACA<br>CCAAAGAACCCACACCGGCGAGAAACCCACCGGAAAAAAGA<br>CCAGC |
| ZF6 (нт) | 43 | CTGGAGCCCGGCGAAAAGCCTTACAAATGTCCCGAGTGCGG<br>AAAGTCCTTCAGCGACCCCGGCGCTCTGGTGAGACATCAAAG<br>AACACATACCGGCGAGAAACCTTATAAATGCCCCGAATGTG<br>GAAAATCCTTCAGCGAAAGAAGCCATCTGAGGGAACACCAG<br>AGGACCCACACCGGCGAAAAACCTTATAAGTGCCCCGAATG<br>CGGAAAAAGCTTTTCTAGAAGCGATCATCTGACCAACCATCA<br>GAGAACACACACCGGCGAAAAGCCCTATAAATGTCCCGAGT<br>GTGGCAAATCCTTTAGCGAGAGGTCCCATCTGAGAGAGCACC<br>AGAGGACACATACCGGAGAGAAGCCCTACAAGTGCCCCGAG<br>TGTGGCAAGAGCTTTAGCAGAAGCGACCATCTGACCAATCAT<br>CAAAGGACCCACACCGGAGAGAAGCCTTACAAGTGTCCCGA<br>GTGCGGAAAGTCCTTTTCCGATCCCGGCCACCTCGTGAGGCA<br>CCAAAGAACCCATACCGGCGAGAAACCCTACAAATGCCCCG<br>AGTGTGGAAAGAGCTTCTCCAGAAGCGACAAGCTGGTGAGG<br>CATCAGAGGACACACACCGGCGAAAAACCCACCGGCAAGAA<br>AACCAGC |

| | | |
|---|---|---|
| ZF7 (нт) | 44 | CTGGAGCCCGGAGAGAAGCCCTACAAATGCCCCGAGTGTGG<br>AAAGAGCTTCTCTAGAAATGACGCTCTGAC<br>AGAACACCAGAGGACCCATACCGGCGAGAAACCTTACAAAT<br>GCCCCGAGTGCGGAAAAAGCTTTAGCGATT<br>GCAGAGATCTGGCTAGACATCAGAGAACACACACCGGCGAG<br>AAGCCCTATAAGTGCCCCGAATGCGGCAA<br>GAGCTTTAGCGACCCCGGCCATCTGGTGAGACATCAAAGGAC<br>ACATACCGGAGAAAAACCTTACAAGTGCC<br>CCGAGTGCGGAAAGTCCTTCTCCCAGAGCGGCCATCTCACCG<br>AGCATCAAAGGACCCACACCGGCGAAAAG<br>CCTTATAAATGTCCCGAATGTGGCAAGTCCTTCTCTAGAGAG<br>GATAATCTGCACACCCATCAGAGGACCCAC<br>ACCGGCGAAAAGCCTTATAAATGCCCCGAATGTGGAAAGTC<br>CTTTTCCACCAAGAACTCTCTGACCGAGCAT<br>CAGAGGACACACACCGGAGAGAAACCCTATAAATGTCCCGA<br>GTGTGGCAAGAGCTTCAGCAGAGCCGACAATCTGACAGAGC<br>ACCAAAGAACACATACCGGCGAAAAGCCCACCGGCAAAAAG<br>ACCAGC |
| ZF8 (нт) | 45 | CTGGAGCCCGGCGAGAAACCCTACAAGTGCCCCGAGTGTGG<br>CAAATCCTTCTCTAGATCCGACAAACTGAC<br>CGAACATCAGAGGACCCATACCGGCGAAAAACCTTATAAAT<br>GTCCCGAGTGCGGAAAGTCCTTCTCTAGAA<br>GGGACGAGCTGAACGTGCATCAGAGAACACATACCGGCGAG<br>AAGCCCTATAAATGCCCCGAATGCGGCAA<br>AAGCTTCTCTAGAAGCGATCATCTGACCAACCACCAGAGAAC<br>CCATACCGGAGAAAAGCCTTACAAGTGTC<br>CCGAATGTGGAAAATCCTTCAGCTCCCCCGCCGATCTGACCA<br>GACACCAAAGGACCCACACCGGCGAGAAG<br>CCCTATAAATGCCCCGAGTGCGGCAAGAGCTTTTCCAGATCC<br>GACCATCTGACCAATCATCAAAGAACCCAC<br>ACCGGCGAAAAGCCTTATAAATGTCCCGAGTGCGGCAAATCC<br>TTTTCCAGCAAGAAGGCTCTGACCGAGCA<br>TCAAAGGACCCATACCGGCGAGAAGCCTTACAAATGCCCCG<br>AGTGTGGAAAGTCCTTTAGCACCCATCTGGATCTGATTAGAC<br>ACCAGAGGACACACACCGGAGAGAAACCCACCGGCAAAAAG |

| | | |
|---|---|---|
| | | ACCAGC |
| ZF9 (нт) | 46 | CTGGAGCCCGGCGAGAAACCTTACAAATGCCCCGAGTGCGG CAAGAGCTTCAGCAGAAGCGACGATCTGGT GAGGCACCAAAGAACCCACACCGGCGAAAAACCTTACAAGT GTCCCGAATGCGGAAAGTCCTTCAGCAGAG AGGACAATCTGCACACCCACCAGAGAACACACACCGGAGAA AAGCCTTACAAGTGCCCCGAATGCGGCAA ATCCTTTTCTAGAAGCGATCATCTGACCACCCACCAAAGAAC ACATACCGGCGAGAAGCCTTACAAATGTCC CGAGTGCGGAAAGTCCTTCTCCCAGAGAGCCAATCTGAGGGC TCATCAAAGGACCCATACCGGCGAAAAGC CCTACAAATGCCCCGAGTGCGGAAAATCCTTCAGCCAGCTGG CCCATCTGAGAGCCCACCAAAGGACACAC ACCGGAGAGAAACCCTATAAGTGCCCCGAGTGTGGAAAAAG CTTTTCCCAGAGGGCCAATCTGAGGGCCCA TCAGAGGACCCATACCGGAGAGAAGCCTTATAAATGTCCCG AGTGCGGAAAAAGCTTCAGCGAGAGGAGCCATCTGAGGGAA CATCAAAGAACCCACACCGGCGAAAAACCCACCGGAAAAAA GACCAGC |
| ZF10 (нт) | 47 | CTGGAGCCCGGCGAGAAACCCTACAAGTGCCCCGAGTGTGG AAAAAGCTTTAGCCAAAGCGGCGATCTGAGGAGACACCAAA GAACACACACCGGCGAGAAGCCCTACAAATGTCCCGAGTGC GGAAAGAGCTTCAGCCAGAGCGGCCATCTGACCGAGCATCA GAGAACCCATACCGGCGAAAAACCTTATAAGTGCCCCGAGT GTGGAAAGTCCTTCTCCGAGAGATCCCATCTGAGAGAACACC AGAGGACACACACCGGCGAAAAACCTTATAAGTGTCCCGAG TGCGGAAAGTCCTTCAGCGATCCCGGCCATCTGGTGAGACAT CAAAGGACACATACCGGCGAAAAACCTTATAAGTGTCCCGA ATGCGGCAAGAGCTTTAGCAGAAACGACACACTCACCGAAC ACCAGAGGACCCACACCGGCGAGAAACCCTACAAATGCCCC GAGTGCGGCAAATCCTTTTCTAGAGCCGACAATCTGACCGAA CACCAGAGGACCCATACCGGAGAAAAGCCTTACAAATGTCC CGAGTGTGGCAAATCCTTCTCCACCCATCTGGATCTGATTAG ACACCAAAGAACACATACCGGAGAAAAGCCCACCGGAAAAA AGACCAGC |

| | | |
|---|---|---|
| ZF11 (нт) | 48 | CTGGAGCCCGGCGAAAAACCCTATAAGTGCCCCGAATGTGG<br>AAAGAGCTTCAGCCATACCGGCCATCTGCT<br>GGAACACCAAAGGACACACACCGGCGAGAAACCTTACAAGT<br>GTCCCGAGTGCGGAAAAAGCTTCTCCTCCA<br>AAAAGGCTCTCACCGAGCACCAGAGAACACATACCGGCGAA<br>AAGCCTTATAAGTGCCCCGAGTGTGGCAAA<br>TCCTTTTCCGACTGTAGAGATCTGGCCAGACATCAAAGAACC<br>CACACCGGAGAGAAACCTTATAAATGCCCC<br>GAGTGCGGCAAGTCCTTTAGCCATACCGGCCATCTGCTGGAG<br>CACCAGAGGACCCATACCGGCGAGAAGCC<br>TTACAAATGCCCCGAGTGCGGCAAAAGCTTCAGCAGAAATG<br>ACGCTCTGACCGAGCATCAAAGGACCCATA<br>CCGGCGAAAAGCCCTACAAGTGTCCCGAGTGTGGAAAGTCCT<br>TCTCCCAGAGCGGCGATCTGAGGAGACAC<br>CAGAGAACACACACCGGCGAGAAACCCTATAAATGTCCCGA<br>GTGCGGAAAGAGCTTTAGCGACAGCGGCAATCTGAGGGTGC<br>ATCAAAGAACACACACCGGCGAAAAACCCACCGGAAAAAAG<br>ACAAGC |
| ZF12 (нт) | 49 | CACCGGCGAAAAGCCTTATAAGTGCCCCGAGTGCGGCAAGT<br>CCTTCTCTAGAAGCGATCACCTCACCAATCA<br>TCAGAGGACACATACCGGAGAGAAGCCCTATAAGTGCCCCG<br>AGTGCGGCAAGAGCTTTAGCCAGCTGGCTC<br>ATCTGAGAGCTCACCAAAGAACCCATACCGGCGAGAAGCCT<br>TACAAATGCCCCGAGTGTGGAAAATCCTTT<br>TCCCAGTCCAGCAACCTCGTCAGACATCAAAGGACCCATACC<br>GGCGAAAAGCCTTACAAGTGTCCCGAGTG<br>CGGAAAGTCCTTCTCTAGATCCGACAACCTCGTGAGGCACCA<br>GAGAACCCACACCGGCGAGAAACCTTACA<br>AATGTCCCGAGTGTGGCAAAAGCTTTTCTAGAAGCGACGAGC<br>TGGTGAGACATCAAAGAACCCATACCGGC<br>GAAAAACCTTATAAGTGTCCCGAGTGCGGCAAATCCTTTAGC<br>CAGCTGGCCCATCTGAGGGCCCACCAGAGAACACATACCGG<br>CGAAAAACCCACCGGCAAAAAGACAAGC |

| | | |
|---|---|---|
| ZF12 (нт) Полной длины | 115 | CTGGAGCCCGGCGAGAAACCCTATAAATGCCCCGAATGCGG<br>AAAAAGCTTCAGCCAGTCCAGCTCTCTGGTGAGACATCAGAG<br>GACACACACCGGCGAAAAGCCTTATAAGTGCCCCGAGTGCG<br>GCAAGTCCTTCTCTAGAAGCGATCACCTCACCAATCATCAGA<br>GGACACATACCGGAGAGAAGCCCTATAAGTGCCCCGAGTGC<br>GGCAAGAGCTTTAGCCAGCTGGCTCATCTGAGAGCTCACCAA<br>AGAACCCATACCGGCGAGAAGCCTTACAAATGCCCCGAGTG<br>TGGAAAATCCTTTTCCCAGTCCAGCAACCTCGTCAGACATCA<br>AAGGACCCATACCGGCGAAAAGCCTTACAAGTGTCCCGAGT<br>GCGGAAAGTCCTTCTCTAGATCCGACAACCTCGTGAGGCACC<br>AGAGAACCCACACCGGCGAGAAACCTTACAAATGTCCCGAG<br>TGTGGCAAAAGCTTTTCTAGAAGCGACGAGCTGGTGAGACAT<br>CAAAGAACCCATACCGGCGAAAAACCTTATAAGTGTCCCGA<br>GTGCGGCAAATCCTTTAGCCAGCTGGCCCATCTGAGGGCCCA<br>CCAGAGAACACATACCGGCGAAAAACCCACCGGCAAAAAGA<br>CAAGC |
| ZF9 | 131 | CUGGAGCCCGGCGAGAAACCUUACAAAUGCCCCGAGUGCGG<br>CAAGAGCUUCAGCAGAAGCGACGAUCUGGUGAGGCACCAA<br>AGAACCCACACCGGCGAAAAACCUUACAAGUGUCCCGAAUG<br>CGGAAAGUCCUUCAGCAGAGAGGACAAUCUGCACACCCACC<br>AGAGAACACACACCGGAGAAAAGCCUUACAAGUGCCCCGA<br>AUGCGGCAAAUCCUUUUCUAGAAGCGAUCAUCUGACCACCC<br>ACCAAAGAACACAUACCGGCGAGAAGCCUUACAAAUGUCCC<br>GAGUGCGGAAAGUCCUUCUCCCAGAGAGCCAAUCUGAGGG<br>CUCAUCAAAGGACCCAUACCGGCGAAAAGCCCUACAAAUGC<br>CCCGAGUGCGGAAAAUCCUUCAGCCAGCUGGCCCAUCUGAG<br>AGCCCACCAAAGGACACACACCGGAGAGAAACCCUAUAAGU<br>GCCCCGAGUGUGGAAAAAGCUUUUCCCAGAGGGCCAAUCU<br>GAGGGCCCAUCAGAGGACCCAUACCGGAGAGAAGCCUUAU<br>AAAUGUCCCGAGUGCGGAAAAAGCUUCAGCGAGAGGAGCC<br>AUCUGAGGGAACAUCAAAGAACCCACACCGGCGAAAAACCC<br>ACCGGAAAAAAGACCAGC |

| | | |
|---|---|---|
| ZF54 | 173 | CTGGAGCCTGGAGAGAAACCCTACAAATGCCCGGAATGCGG<br>GAAGTCCTTTTCCGAACGCTCGCACCTGAGGGAACACCAGAG<br>AACTCACACCGGCGAAAAACCCTATAAGTGCCCAGAATGCG<br>GAAAGAGCTTTTCACGGTCGGACAACCTCGTGCGGCACCAAC<br>GCACTCATACCGGAGAGAAGCCGTACAAGTGTCCTGAGTGC<br>GGAAAGTCATTCTCCGACTGCCGGGATTTGGCCCGCCACCAA<br>AGAACACACACTGGCGAAAAGCCCTACAAGTGCCCGGAGTG<br>TGGAAAGTCCTTCAGCACTTCCGGAGAGCTGGTCCGGCACCA<br>GAGGACCCACACCGGGGAGAAGCCTTACAAATGTCCAGAGT<br>GCGGTAAAAGCTTCTCCACCACCGGCAACCTCACCGTGCACC<br>AGCGGACCCACACTGGAGAAAAGCCGTATAAATGCCCCGAA<br>TGCGGCAAGAGCTTCTCGCGATCCGATAAGCTTGTGCGGCAT<br>CAGAGAACGCACACTGGGGAAAAGCCTTATAAGTGTCCGGA<br>GTGCGGCAAATCCTTCTCCCGCACTGACACCCTGCGGGACCA<br>TCAGCGCACCCATACCGGCAAAAAGACCTCT |
| ZF61 | 174 | CTTGAACCCGGGGAGAAGCCCTACAAGTGCCCGGAATGCGG<br>AAAGAGCTTCAGCCAGAAGTCCTCGCTGATCGCGCACCAGA<br>GGACTCACACCGGCGAAAAGCCATACAAGTGTCCTGAGTGT<br>GGCAAATCCTTCTCGCACAAGAACGCACTGCAGAACCACCA<br>GAGAACCCACACCGGGGAAAAGCCGTATAAGTGCCCCGAAT<br>GTGGAAAGTCGTTCAGCCAGTCATCCAACCTCGTGCGCCATC<br>AAAGGACTCATACCGGAGAGAAACCTTACAAATGCCCTGAA<br>TGCGGCAAATCTTTCTCCCGGAATGATGCCCTGACCGAGCAC<br>CAGCGCACTCACACGGGAGAGAAGCCGTACAAATGTCCGGA<br>GTGCGGAAAGTCCTTCTCCGACAAGAAGGACTTGACCAGAC<br>ACCAGCGGACCCATACTGGCGAAAAACCCTATAAGTGTCCA<br>GAGTGCGGGAAGTCCTTTAGCCAAGCCGGTCACCTCGCTTCC<br>CACCAACGGACCCACACAGGAGAAAAGCCTTATAAATGCCC<br>CGAGTGCGGCAAAAGCTTCTCCGATAAGAAGGACCTGACTC<br>GGCATCAGCGCACCCATACCGGAAAGAAAACCTCA |
| ZF67 | 175 | CTGGAGCCTGGCGAAAAACCCTATAAGTGCCCAGAATGCGG<br>AAAGAGCTTTTCACGGTCGGACAACCTCGTGCGGCACCAACG<br>CACTCATACCGGAGAGAAGCCGTACAAGTGTCCTGAGTGCG<br>GAAAGTCATTCTCCGACTGCCGGGATTTGGCCCGCCACCAAA<br>GAACACACACTGGCGAAAAGCCCTACAAGTGCCCGGAGTGT |

| | | |
|---|---|---|
| | | GGAAAGTCCTTCAGCACTTCCGGAGAGCTGGTCCGGCACCAG<br>AGGACCCACACCGGGGAGAAGCCTTACAAATGTCCAGAGTG<br>CGGTAAAAGCTTCTCCACCACCGGCAACCTCACCGTGCACCA<br>GCGGACCCACACTGGAGAAAAGCCGTATAAATGCCCCGAAT<br>GCGGCAAGAGCTTCTCGCGATCCGATAAGCTTGTGCGGCATC<br>AGAGAACGCACACTGGGGAAAAGCCTTATAAGTGTCCGGAG<br>TGCGGCAAATCCTTCTCCCGCACTGACACCCTGCGGGACCAC<br>CAGAGAACCCATACTGGCGAGAAGCCATACAAATGCCCGGA<br>ATGTGGAAAGAGTTTCTCGCGCGAGGACAACCTCCACACCCA<br>TCAGCGCACCCATACCGGCAAAAAGACCTCT |
| ZF68 | 176 | CTGGAACCCGGAGAGAAACCCTACAAATGCCCAGAGTGCGG<br>CAAATCGTTCTCACGGTCCGATCACCTCACCACCCACCAGAG<br>GACCCATACCGGGGAGAAGCCTTACAAGTGTCCTGAGTGTGG<br>AAAGTCCTTCAGCCAAAAGTCCTCGCTGATCGCACACCAGCG<br>CACGCACACTGGGGAAAAGCCATATAAATGCCCGGAGTGTG<br>GCAAATCCTTCTCCCGCCGCGACGAACTGAACGTGCACCAGA<br>GAACCCACACTGGAGAGAAGCCGTATAAGTGTCCGGAGTGC<br>GGAAAGAGCTTCTCGCAATCCGGGGACCTTCGGAGACATCA<br>GAGGACACACACTGGCGAAAAGCCCTATAAGTGCCCTGAGT<br>GCGGGAAGTCCTTTAGCCAAGCCGGTCACCTGGCCTCCCACC<br>AACGGACTCACACCGGCGAAAAACCGTACAAGTGCCCCGAA<br>TGCGGAAAGTCGTTCTCTACCTCCGGAAACTTGACCGAACAC<br>CAGCGGACCCACACCGGAGAAAAGCCGTACAAATGTCCTGA<br>ATGCGGCAAAAGCTTCAGCCAGGCCGGTCATCTCGCGAGCCA<br>TCAGCGGACTCATACTGGCAAAAAGACCTCA |

В некоторых вариантах осуществления репрессор экспрессии содержит нацеливающуюся функциональную группу, содержащую сконструированный ДНК-связывающий домен (DBD), например домен по типу "Zn-пальца", содержащий "Zn-палец" (ZFN), который связывается с последовательностью-мишенью, например последовательностью промотора или сайта начала транскрипции (TSS)), функционально связанной с геном-мишенью (например, MYC), например последовательностью, проксимальной по отношению к регуляторному элементу транскрипции, например якорной последовательностью объединения, опосредованного якорной последовательностью (ASMC), содержащего ген-мишень (например, MYC), например последовательностью, проксимальной по отношению к якорной последовательности. В некоторых вариантах осуществления ZFN может быть сконструирован так, чтобы нести

эпигенетические эффекторные молекулы к сайтам-мишеням. В некоторых вариантах осуществления нацеливающаяся функциональная группа содержит домен по типу "Zn-пальца", который содержит 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 "цинковых пальцев". Аминокислотные последовательности иллюстративных нацеливающихся функциональных групп, раскрытых в данном документе, перечислены в таблице 14. Нуклеотидные последовательности, кодирующие иллюстративные нацеливающиеся функциональные группы, раскрытые в данном документе, перечислены в таблице 15. В некоторых вариантах осуществления репрессор экспрессии или система, описанные в данном документе, содержат нацеливающуюся функциональную группу, содержащую последовательность, изложенную в таблице 14, или последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентичностью с ней. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота, описанная в данном документе, содержит последовательность, изложенную в таблице 15, или последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентичностью с ней.

Таблица 14. Аминокислотные последовательности иллюстративных нацеливающихся функциональных групп, специфичных для мыши

| Название | SEQ ID NO: | ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ |
|---|---|---|
| ZF15 (а. к.) | 154 | LEPGEKPYKCPECGKSFSTSGELVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSERSHLREHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSRNDTLTEHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSRADNLTEHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSTSGSLVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSSPADLTRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSDSGNLRVHQRTHTGEKPTGKKTS |
| ZF16 (а. к.) | 155 | LEPGEKPYKCPECGKSFSRSDKLVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQRANLRAHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSRADNLTEHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQSSSLVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSDKKDLTRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSSPADLTRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQSGHLTEHQRTHTGEKPTGKKTS |
| ZF17 (а. к.) | 156 | LEPGEKPYKCPECGKSFSQSGDLRRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQSGDLRRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSERSHLREHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSTTGNLTVHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSHRTTLTNHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSDSGNLRVHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQSSSLVRHQRTHTGEKPTGKKTS |

Таблица 15. Нуклеотидные последовательности иллюстративных нацеливающихся функциональных групп, специфичных для мыши

| Название | SEQ ID NO: | ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ |
|---|---|---|
| ZF15, нт | 157 | CTTGAGCCCGGAGAAAAGCCATACAAATGTCCTGAATG<br>CGGAAAGTCATTTTCTACGAGCGGCGAACTCGTGCGGC<br>ACCAAAGGACTCATACCGGCGAAAAGCCTTACAAATGC<br>CCGGAGTGCGGAAAAAGCTTCTCCGAGCGCTCGCACTT<br>GCGGGAACACCAGCGAACCCACACAGGGGAGAAACCG<br>TATAAGTGCCCAGAGTGCGGCAAATCGTTCTCCCGGAA<br>CGACACCCTGACCGAACACCAACGCACTCATACTGGCG<br>AAAAACCTTACAAGTGCCCTGAGTGTGGAAAGAGCTTC<br>TCCCGCGCCGATAACCTGACCGAGCACCAGCGGACCCA<br>TACCGGGGAAAAGCCGTACAAGTGTCCGGAATGCGGC<br>AAAAGCTTCAGCACCTCGGGTTCCCTGGTCCGGCATCA<br>GAGAACTCACACCGGAGAGAAACCCTATAAGTGTCCTG<br>AGTGCGGGAAGTCCTTTTCATCGCCCGCGGACCTGACT<br>AGACACCAGAGGACCCACACCGGGGAGAAGCCCTACA<br>AGTGCCCCGAATGTGGAAAGTCCTTCTCCGACTCCGGC<br>AACCTCCGGGTGCACCAGCGCACCCACACTGGAGAGA<br>AGCCGACCGGAAAGAAAACTTCC |
| ZF16, нт | 158 | CTGGAACCCGGAGAAAAACCTTATAAGTGCCCTGAATG<br>CGGAAAGTCATTCTCGAGGTCGGACAAGCTCGTGCGGC<br>ACCAGAGGACACACACCGGGGAAAAGCCATACAAGTG<br>TCCCGAATGTGGAAAGTCCTTCAGCCAACGCGCCAACC<br>TGAGAGCTCATCAGCGGACTCACACTGGCGAAAAACCG<br>TACAAATGCCCCGAATGCGGCAAAAGCTTCTCCCGCGC<br>CGACAACTTGACCGAGCACCAGCGGACCCATACCGGCG<br>AAAAGCCGTACAAGTGCCCGGAGTGTGGGAAGTCGTTC<br>AGCCAGTCCTCTTCCCTCGTGCGCCACCAACGCACCCA<br>TACTGGGGAGAAGCCCTATAAGTGTCCTGAGTGTGGCA<br>AATCATTCAGCGATAAGAAGGATCTTACCCGGCACCAA<br>CGGACTCATACCGGAGAGAAGCCTTACAAGTGCCCCGA<br>GTGCGGAAAGAGCTTCTCGTCCCCGGCGGACCTGACTA<br>GACACCAGCGCACCCACACCGGAGAAAAGCCCTACAA |

| | | |
|---|---|---|
| | | GTGCCCAGAGTGCGGGAAGTCCTTTTCCCAATCCGGTC<br>ACCTGACTGAGCACCAGAGAACCCACACGGGAGAGAA<br>ACCGACCGGAAAGAAAACCTCC |
| ZF17, нт | 159 | TTGGAACCCGGAGAAAAGCCATACAAATGCCCCGAAT<br>GCGGAAAGTCGTTCAGCCAGTCCGGCGACCTCAGACGG<br>CACCAACGGACTCACACCGGCGAAAAACCGTACAAGT<br>GCCCAGAGTGCGGCAAAAGCTTTAGCCAGTCGGGCGAT<br>CTGCGGAGACATCAGCGCACTCACACTGGTGAAAAGCC<br>CTACAAGTGTCCTGAGTGCGGGAAGTCCTTCAGCGAGC<br>GCTCCCATCTTCGCGAGCACCAGAGAACCCACACTGGA<br>GAAAAACCTTATAAGTGCCCTGAGTGTGGCAAATCCTT<br>CTCAACCACCGGCAACCTGACTGTGCACCAGCGGACCC<br>ACACAGGGGAGAAGCCTTACAAGTGCCCGGAGTGTGG<br>GAAGTCATTCTCCCATCGGACGACCCTGACCAACCACC<br>AGAGGACCCATACTGGCGAAAAGCCGTATAAGTGTCCG<br>GAGTGCGGAAAGAGCTTCTCCGACTCCGGAAACCTCAG<br>GGTGCACCAACGCACCCACACCGGAGAGAAGCCGTAC<br>AAATGTCCCGAATGTGGAAAGTCCTTCTCCCAATCCTCT<br>TCGCTGGTCCGGCACCAGCGAACTCATACCGGGGAAAA<br>GCCCACCGGAAAGAAAACCTCG |

Молекула нуклеиновой кислоты

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

В некоторых вариантах осуществления функциональная группа, нацеливающаяся на ДНК, содержит или представляет собой нуклеиновую кислоту. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота, которая может быть включена в функциональную

группу, нацеливающуюся на ДНК, может представлять собой или содержать ДНК, РНК и/или искусственную или синтетическую нуклеиновую кислоту или аналог или имитатор нуклеиновой кислоты. Например, в некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота может представлять собой или предусматривать одно или несколько из геномной ДНК (gDNA), комплементарной ДНК (cDNA), пептидной нуклеиновой кислоты (PNA), конъюгата пептид-олигонуклеотид, запертой нуклеиновой кислоты (LNA), мостиковой нуклеиновой кислоты (BNA), полиамида, триплекс-образующего олигонуклеотида, антисмыслового олигонуклеотида, tRNA, mRNA, rRNA, miRNA, gRNA, siRNA или другой молекулы RNAi (например, которая целенаправленно воздействует на некодирующую РНК, которая описана в данном документе, и/или которая целенаправленно воздействует на продукт экспрессии конкретного гена, ассоциированного с геномным комплексом-мишенью, который описан в данном документе) и т. д. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота может содержать один или несколько остатков, которые не являются встречающимися в природе остатками ДНК или РНК, может содержать одну или несколько связей, которые не являются сложными фосфодиэфирными связями (например, это могут быть, например, фосфотиоатные связи и т. д.), и/или может содержать одну или несколько модификаций, таких как, например, модификация 2'O, такая как 2'-OmeP. Из уровня техники известны различные структуры нуклеиновых кислот, пригодные для получения синтетических нуклеиновых кислот (см., например, WO 2017/062862l и WO 2014/012081), при этом специалисты в данной области поймут, что их можно применять в соответствии с настоящим изобретением.

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

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

170, 30-170, 40-170, 50-170, 60-170, 70-170, 80-170, 90-170, 100-170, 110-170, 120-170, 130-170, 140-170, 150-170, 160-170, 15-160, 20-160, 30-160, 40-160, 50-160, 60-160, 70-160, 80-160, 90-160, 100-160, 110-160, 120-160, 130-160, 140-160, 150-160, 215-150, 20-150, 30-150, 40-150, 50-150, 60-150, 70-150, 80-150, 90-150, 100-150, 110-150, 120-150, 130-150, 140-150, 15-140, 20-140, 30-140, 40-140, 50-140, 60-140, 70-140, 80-140, 90-140, 100-140, 110-140, 120-140, 130-140, 15-130, 20-130, 30-130, 40-130, 50-130, 60-130, 70-130, 80-130, 90-130, 100-130, 110-130, 120-130, 215-120, 20-120, 30-120, 40-120, 50-120, 60-120, 70-120, 80-120, 90-120, 100-120, 110-120, 15-110, 20-110, 30-110, 40-110, 50-110, 60-110, 70-110, 80-110, 90-110, 100-110, 15-100, 20-100, 30-100, 40-100, 50-100, 60-100, 70-100, 80-100, 90-100, 15-90, 20-90, 30-90, 40-90, 50-90, 60-90, 70-90, 80-90, 15-80, 20-80, 30-80, 40-80, 50-80, 60-80, 70-80, 15-70, 20-70, 30-70, 40-70, 50-70, 60-70, 15-60, 20-60, 30-60, 40-60, 50-60, 15-50, 20-50, 30-50, 40-50, 15-40, 20-40, 30-40, 15-30, 20-30, или 15-20 нуклеотидов или в любом диапазоне между ними.

Эффекторные функциональные группы

В некоторых вариантах осуществления репрессоры экспрессии по настоящему изобретению содержат одну или несколько эффекторных функциональных групп. В некоторых вариантах осуществления эффекторная функциональная группа при применении в качестве части репрессора экспрессора или системы репрессии экспрессии, которые описаны в данном документе, снижает уровень экспрессии гена-мишени в клетке.

В некоторых вариантах осуществления эффекторная функциональная группа обладает функциональностью, не связанной со связыванием нацеливающейся функциональной группы. Например, эффекторные функциональные группы могут целенаправленно воздействовать, например связываться, на элемент геномной последовательности или компонент геномного комплекса, проксимальный по отношению к элементу геномной последовательности, на который нацелена нацеливающаяся функциональная группа, или рекрутировать фактор транскрипции. В качестве дополнительного примера эффекторная функциональная группа может характеризоваться ферментативной активностью, например функциональным свойством в отношении генетической модификации.

В некоторых вариантах осуществления эффекторная функциональная группа содержит эпигенетическую модифицирующую функциональную группу. В некоторых вариантах осуществления эффекторная функциональная группа характеризуется ДНК-модифицирующим функциональным свойством, например ДНК-метилтрансферазы. В некоторых вариантах осуществления эффекторная функциональная группа представляет собой или предусматривает белок, выбранный из MQ1, DNMT1, DNMT3A1, DNMT3A2, DNMT3B1, DNMT3B2, DNMT3B3, DNMT3B4, DNMT3B5, DNMT3B6, DNMT3L или функционального варианта или фрагмента любого из них.

В некоторых вариантах осуществления эффекторная функциональная группа содержит репрессор транскрипции. В некоторых вариантах осуществления репрессор транскрипции блокирует рекрутинг фактора, который стимулирует или способствует

транскрипции, например гена-мишени. В некоторых вариантах осуществления репрессор транскрипции рекрутирует фактор, который подавляет транскрипцию, например гена-мишени. В некоторых вариантах осуществления эффекторная функциональная группа, например, репрессор транскрипции, представляет собой или предусматривает белок, выбранный из KRAB, MeCP2, HP1, RBBP4, REST, FOG1, SUZ12 или функционального варианта или фрагмента любого из них.

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

В некоторых вариантах осуществления эффекторная функциональная группа характеризуется гистон-модифицирующим функциональным свойством, например активностью гистонметилтрансферазы, гистондеметилазы или гистондеацетилазы. В некоторых вариантах осуществления эффекторная функциональная группа представляет собой или предусматривает белок, выбранный из KDM1A (т. е., LSD1), KDM1B (т. е., LSD2), KDM2A, KDM2B, KDM5A, KDM5B, KDM5C, KDM5D, KDM4B, NO66 или функционального варианта или фрагмента любого из них. В некоторых вариантах осуществления эффекторная функциональная группа представляет собой или предусматривает белок, выбранный из HDAC1, HDAC2, HDAC3, HDAC4, HDAC5, HDAC6, HDAC7, HDAC8, HDAC9, HDAC10, HDAC11, SIRT1, SIRT2, SIRT3, SIRT4, SIRT5, SIRT6, SIRT7, SIRT8, SIRT9 или функционального варианта или фрагмента любого из них.

В некоторых вариантах осуществления эффекторная функциональная группа предусматривает белок, функциональное свойство которого описано в данном документе. В некоторых вариантах осуществления эффекторная функциональная группа представляет собой или предусматривает белок, выбранный из KRAB (например, такого, как в соответствии с NP_056209.2, или белка, кодируемого NM_015394.5); домена SET (например, домена SET из SETDB1 (например, такого, как в соответствии с NP_001353347.1, или белка, кодируемого NM_001366418.1); EZH2 (например, такого, как в соответствии с NP-004447.2, или белка, кодируемого NM_004456.5); G9A (например, такого, как в соответствии с NP_001350618.1, или белка, кодируемого NM_001363689.1) или SUV39H1 (например, такого, как в соответствии с NP_003164.1, или белка, кодируемого NM_003173.4)); гистондеметилазы LSD1 (например, такой, как в соответствии с NP_055828.2, или белка, кодируемого NM_015013.4); FOG1 (например, N-концевых остатков FOG1) (например, такого, как в соответствии с NP_722520.2, или

белка, кодируемого NM_153813.3) или KAP1 (например, такого, как в соответствии с NP_005753.1, или белка, кодируемого NM_005762.3); функционального фрагмента или варианта любого из них или полипептида с последовательностью, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичностью с любой из вышеуказанных последовательностей.

В некоторых вариантах осуществления эффекторная функциональная группа представляет собой или предусматривает белок, выбранный из DNMT3A (например, DNMT3A человека) (например, такого, как в соответствии с NP_072046.2, или белка, кодируемого NM_022552.4); DNMT3B (например, такого, как в соответствии с NP_008823.1, или белка, кодируемого NM_006892.4); DNMT3L (например, такого, как в соответствии с NP_787063.1, или белка, кодируемого NM_175867.3); комплекса DNMT3A/3L, бактериальной MQ1 (например, такой, как в соответствии с CAA35058.1 или P15840.3); функционального фрагмента любых из них или полипептида с последовательностью, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичностью с любой из вышеуказанных последовательностей.

В другом аспекте настоящее изобретение направлено на репрессор экспрессии или полипептид, содержащие одну или несколько (например, одну) нацеливающихся функциональных групп и одну или несколько эффекторных функциональных групп, где одна или несколько эффекторных функциональных групп представляют собой или предусматривают круппель-ассоциированный блок доменов (KRAB), например такой, как в соответствии с NP_056209.2, или белок, кодируемый NM_015394.5, или его функциональный вариант или фрагмент. В некоторых вариантах осуществления KRAB представляет собой синтетическую конструкцию KRAB. В некоторых вариантах осуществления KRAB содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 18:

DAKSLTAWSRTLVTFKDVFVDFTREEWKLLDTAQQILYRNVMLENYKNLVSLG YQLTKPDVILRLEKGEEPWLVEREIHQETHPDSETAFEIKSSV (SEQ ID NO: 18).

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

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

В некоторых вариантах осуществления KRAB для применения в полипептиде или

репрессоре экспрессии, описанных в данном документе, представляет собой вариант, например содержащий одну или несколько мутаций по сравнению с последовательностью KRAB под SEQ ID NO: 18. В некоторых вариантах осуществления вариант KRAB предусматривает одну или несколько аминокислотных замен, делеций или вставок по сравнению с SEQ ID NO: 18.

В некоторых вариантах осуществления полипептид или репрессор экспрессии представляют собой слитый белок, содержащий эффекторную функциональную группу, которая представляет собой или предусматривает KRAB, и функциональную группу, нацеливающуюся на ДНК. В некоторых вариантах осуществления нацеливающаяся функциональная группа представляет собой или предусматривает домен по типу "цинкового пальца", домен TAL или домен CRISPR/Cas, например, предусматривающий белок CRISPR/Cas, например белок dCas9. В некоторых вариантах осуществления полипептид или репрессор экспрессии содержат дополнительную функциональную группу, описанную в данном документе. В некоторых вариантах осуществления полипептид или репрессор экспрессии обеспечивают снижение уровня экспрессии гена-мишени, например MYC. В некоторых вариантах осуществления полипептид или репрессор экспрессии можно применять в способах модулирования, например снижения, уровня экспрессии генов, способах лечения состояния или способах эпигенетического модифицирования гена-мишени, например MYC или элемента контроля транскрипции, описанного в данном документе, например, вместо системы репрессии экспрессии. В некоторых вариантах осуществления система репрессии экспрессии содержит два или более (например, два, три или четыре) репрессоров экспрессии, где первый репрессор экспрессии содержит эффекторную функциональную группу, предусматривающую последовательность KRAB под SEQ ID NO: 18 или его функциональный вариант или фрагмент.

В другом аспекте настоящее изобретение направлено на репрессор экспрессии или полипептид, содержащие одну или несколько (например, одну) нацеливающихся функциональных групп и одну или несколько эффекторных функциональных групп, где одна или несколько эффекторных функциональных групп представляют собой или предусматривают MQ1, например MQ1 бактерии, или ее функциональный вариант или фрагмент. В некоторых вариантах осуществления MQ1 представляет собой MQ1 Mollicutes spiroplasma. В некоторых вариантах осуществления MQ1 представляет собой MQ1 Spiroplasma monobiae. В некоторых вариантах осуществления MQ1 представляет собой MQ1 из штамма ATCC 33825 и/или соответствующую записи в Uniprot ID P15840. В некоторых вариантах осуществления MQ1 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 19. В некоторых вариантах осуществления MQ1 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 87. В некоторых вариантах осуществления эффекторный домен, описанный в данном документе, содержит SEQ ID NO: 19 или 87 или последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 99 или 100% идентичностью с ней или имеет не более чем 20, 19, 18, 17, 16,

15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 положение, отличающееся от нее.

SKVENKTKKLRVFEAFAGIGAQRKALEKVRKDEYEIVGLAEWYVPAIVMYQAIH NNFHTKLEYKSVSREEMIDYLENKTLSWNSKNPVSNGYWKRKKDDELKIIYNAIKLSEK EGNIFDIRDLYKRTLKNIDLLTYSFPCQDLSQQGIQKGMKRGSGTRSGLLWEIERALDST EKNDLPKYLLMENVGALLHKKNEEELNQWKQKLESLGYQNSIEVLNAADFGSSQARRR VFMISTLNEFVELPKGDKKPKSIKKVLNKIVSEKDILNNLLKYNLTEFKKTKSNINKASLI GYSKFNSEGYVYDPEFTGPTLTASGANSRIKIKDGSNIRKMNSDETFLYIGFDSQDGKRV NEIEFLTENQKIFVCGNSISVEVLEAIIDKIGG (SEQ ID NO: 19)

MSKVENKTKKLRVFEAFAGIGAQRKALEKVRKDEYEIVGLAEWYVPAIVMYQA IHNNFHT

KLEYKSVSREEMIDYLENKTLSWNSKNPVSNGYWKRKKDDELKIIYNAIKLSEK EGNIFD

IRDLYKRTLKNIDLLTYSFPCQDLSQQGIQKGMKRGSGTRSGLLWEIERALDSTE KNDLP

KYLLMENVGALLHKKNEEELNQWKQKLESLGYQNSIEVLNAADFGSSQARRRV FMISTLN

EFVELPKGDKKPKSIKKVLNKIVSEKDILNNLLKYNLTEFKKTKSNINKASLIGYS KFNS

EGYVYDPEFTGPTLTASGANSRIKIKDGSNIRKMNSDETFLYIGFDSQDGKRVNEI EFLT

ENQKIFVCGNSISVEVLEAIIDKIGG (SEQ ID NO: 87)

В некоторых вариантах осуществления MQ1 кодируется нуклеотидной последовательностью под SEQ ID NO: 52 или 132. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота, описанная в данном документе, содержит последовательность под SEQ ID NO: 52, 132 или последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 99 или 100% идентичностью с ней или имеет не более чем 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 положение, отличающееся от нее.

AGCAAGGTGGAGAACAAGACCAAGAAGCTGCGGGTGTTCGAGGCCTTCGCC GGCATCGGCGCCCAGCGGAAGGCCCTGGAGAAGGTGCGGAAGGACGAGTACGAGA TCGTGGGCCTGGCCGAGTGGTACGTGCCCGCCATCGTGATGTACCAGGCCATCCACA ACAACTTCCACACCAAGCTGGAGTACAAGAGCGTGAGCCGGGAGGAGATGATCGAC TACCTGGAGAACAAGACCCTGAGCTGGAACAGCAAGAACCCCGTGAGCAACGGCTA CTGGAAGCGGAAGAAGGACGACGAGCTGAAGATCATCTACAACGCCATCAAGCTGA GCGAGAAGGAGGGCAACATCTTCGACATCCGGGACCTGTACAAGCGGACCCTGAAG AACATCGACCTGCTGACCTACAGCTTCCCCTGCCAGGACCTGAGCCAGCAGGGCATC CAGAAGGGCATGAAGCGGGGCAGCGGCACCCGGAGCGGCCTGCTGTGGGAGATCG AGCGGGCCCTGGACAGCACCGAGAAGAACGACCTGCCCAAGTACCTGCTGATGGAG AACGTGGGCGCCCTGCTGCACAAGAAGAACGAGGAGGAGCTGAACCAGTGGAAGC AGAAGCTGGAGAGCCTGGGCTACCAGAACAGCATCGAGGTGCTGAACGCCGCCGAC TTCGGCAGCAGCCAGGCCCGGCGGCGGGTGTTCATGATCAGCACCCTGAACGAGTT

CGTGGAGCTGCCCAAGGGCGACAAGAAGCCCAAGAGCATCAAGAAGGTGCTGAAC
AAGATCGTGAGCGAGAAGGACATCCTGAACAACCTGCTGAAGTACAACCTGACCGA
GTTCAAGAAAACCAAGAGCAACATCAACAAGGCCAGCCTGATCGGCTACAGCAAGT
TCAACAGCGAGGGCTACGTGTACGACCCCGAGTTCACCGGCCCCACCCTGACCGCC
AGCGGCGCCAACAGCCGGATCAAGATCAAGGACGGCAGCAACATCCGGAAGATGA
ACAGCGACGAGACCTTCCTGTACATCGGCTTCGACAGCCAGGACGGCAAGCGGGTG
AACGAGATCGAGTTCCTGACCGAGAACCAGAAGATCTTCGTGTGCGGCAACAGCAT
CAGCGTGGAGGTGCTGGAGGCCATCATCGACAAGATCGGCGGC (SEQ ID NO: 52)

AGCAAGGUGGAGAACAAGACCAAGAAGCUGCGGGUGUUCGAGGCCUUCGC
CGGCAUCGGCGCCCAGCGGAAGGCCCUGGAGAAGGUGCGGAAGGACGAGUACGAG
AUCGUGGGCCUGGCCGAGUGGUACGUGCCCGCCAUCGUGAUGUACCAGGCCAUCC
ACAACAACUUCCACACCAAGCUGGAGUACAAGAGCGUGAGCCGGGAGGAGAUGA
UCGACUACCUGGAGAACAAGACCCUGAGCUGGAACAGCAAGAACCCCGUGAGCAA
CGGCUACUGGAAGCGGAAGAAGGACGACGAGCUGAAGAUCAUCUACAACGCCAUC
AAGCUGAGCGAGAAGGAGGGCAACAUCUUCGACAUCCGGGACCUGUACAAGCGG
ACCCUGAAGAACAUCGACCUGCUGACCUACAGCUUCCCCUGCCAGGACCUGAGCC
AGCAGGGCAUCCAGAAGGGCAUGAAGCGGGGCAGCGGCACCCGGAGCGGCCUGCU
GUGGGAGAUCGAGCGGGCCCUGGACAGCACCGAGAAGAACGACCUGCCCAAGUAC
CUGCUGAUGGAGAACGUGGGCGCCCUGCUGCACAAGAAGAACGAGGAGGAGCUG
AACCAGUGGAAGCAGAAGCUGGAGAGCCUGGGCUACCAGAACAGCAUCGAGGUG
CUGAACGCCGCCGACUUCGGCAGCAGCCAGGCCCGGCGGCGGGUGUUCAUGAUCA
GCACCCUGAACGAGUUCGUGGAGCUGCCCAAGGGCGACAAGAAGCCCAAGAGCAU
CAAGAAGGUGCUGAACAAGAUCGUGAGCGAGAAGGACAUCCUGAACAACCUGCU
GAAGUACAACCUGACCGAGUUCAAGAAaACCAAGAGCAACAUCAACAAGGCCAGC
CUGAUCGGCUACAGCAAGUUCAACAGCGAGGGCUACGUGUACGACCCCGAGUUCA
CCGGCCCCACCCUGACCGCCAGCGGCGCCAACAGCCGGAUCAAGAUCAAGGACGG
CAGCAACAUCCGGAAGAUGAACAGCGACGAGACCUUCCUGUACAUCGGCUUCGAC
AGCCAGGACGGCAAGCGGGUGAACGAGAUCGAGUUCCUGACCGAGAACCAGAAG
AUCUUCGUGUGCGGCAACAGCAUCAGCGUGGAGGUGCUGGAGGCCAUCAUCGACA
AGAUCGGCGGC (SEQ ID NO: 132)

В некоторых вариантах осуществления MQ1 для применения в полипептиде или репрессоре экспрессии, описанных в данном документе, представляет собой вариант, например содержащий одну или несколько мутаций по сравнению с MQ1 дикого типа (например, SEQ ID NO: 19). В некоторых вариантах осуществления вариант MQ1 предусматривает одну или несколько аминокислотных замен, делеций или вставок по сравнению с MQ1 дикого типа (например, MQ1 с последовательностью под SEQ ID NO: 19. В некоторых вариантах осуществления вариант MQ1 предусматривает замену K297P. В некоторых вариантах осуществления вариант MQ1 предусматривает замену N299C. В некоторых вариантах осуществления вариант MQ1 предусматривает замену E301Y. В некоторых вариантах осуществления вариант MQ1 предусматривает замену Q147L

(например, и характеризуется сниженным уровнем ДНК-метилтрансферазной активности по сравнению с MQ1 дикого типа). В некоторых вариантах осуществления вариант MQ1 предусматривает замены K297P, N299C и E301Y (например, и характеризуется сниженной аффинностью связывания ДНК по сравнению с MQ1 дикого типа). В некоторых вариантах осуществления вариант MQ1 предусматривает замены Q147L, K297P, N299C и E301Y (например, и характеризуется сниженными уровнем ДНК-метилтрансферазной активности и аффинностью связывания ДНК по сравнению с MQ1 дикого типа).

В некоторых вариантах осуществления полипептид или репрессор экспрессии представляет собой слитый белок, содержащий эффекторную функциональную группу, которая представляет собой или предусматривает MQ1, и нацеливающуюся функциональную группу, которая представляет собой или предусматривает домен по типу "цинкового пальца", домен TAL или домен CRISPR/Cas, домен dCas9. В некоторых вариантах осуществления полипептид или репрессор экспрессии содержат дополнительную функциональную группу, описанную в данном документе. В некоторых вариантах осуществления полипептид или репрессор экспрессии обеспечивают снижение уровня экспрессии гена-мишени, например MYC. В некоторых вариантах осуществления полипептид или репрессор экспрессии можно применять в способах модулирования, например снижения, уровня экспрессии генов, способах лечения состояния или способах эпигенетического модифицирования гена-мишени, например MYC или элемента контроля транскрипции, описанного в данном документе, например, вместо системы репрессии экспрессии. В некоторых вариантах осуществления система репрессии экспрессии содержит два или более (например, два, три или четыре) репрессоров экспрессии, где первый репрессор экспрессии содержит эффекторную функциональную группу, предусматривающую MQ1, например MQ1 бактерии, или ее функциональный вариант или фрагмент.

В другом аспекте настоящее изобретение направлено на репрессор экспрессии или полипептид, содержащие одну или несколько (например, одну) нацеливающихся функциональных групп и одну или несколько эффекторных функциональных групп, где одна или несколько эффекторных функциональных групп представляют собой или предусматривают DNMT1, например DNMT1 человека, или его функциональный вариант или фрагмент. В некоторых вариантах осуществления DNMT1 представляет собой DNMT1 человека, например соответствующий записи в Gene ID 1786, например соответствующий записи в UniPort ID P26358.2. В некоторых вариантах осуществления DNMT1 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 20. В некоторых вариантах осуществления эффекторный домен, описанный в данном документе, содержит последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 20 или последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 99 или 100% идентичностью с ней или имеет не более чем 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 положение, отличающееся от нее:

VDLRTLDVFSGCGGLSEGFHQAGISDTLWAIEMWDPAAQAFRLNNPGSTVFTED

CNILLKLVMAGETTNSRGQRLPQKGDVEMLCGGPPCQGFSGMNRFNSRTYSKFKNSLV
VSFLSYCDYYRPRFFLLENVRNFVSFKRSMVLKLTLRCLVRMGYQCTFGVLQAGQYGV
AQTRRRAIILAAAPGEKLPLFPEPLHVFAPRACQLSVVVDDKKFVSNITRLSSGPFRTITV
RDTMSDLPEVRNGASALEISYNGEPQSWFQRQLRGAQYQPILRDHICKDMSALVAARM
RHIPLAPGSDWRDLPNIEVRLSDGTMARKLRYTHHDRKNGRSSSGALRGVCSCVEAGK
ACDPAARQFNTLIPWCLPHTGNRHNHWAGLYGRLEWDGFFSTTVTNPEPMGKQGRVL
HPEQHRVVSVRECARSQGFPDTYRLFGNILDKHRQVGNAVPPPLAKAIGLEIKLCMLAK
ARESASAKIKEEEAAKD (SEQ ID NO: 20)

В некоторых вариантах осуществления DNMT1 кодируется нуклеотидной последовательностью под SEQ ID NO: 53. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота, описанная в данном документе, содержит последовательность под SEQ ID NO: 53 или последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 99 или 100% идентичностью с ней или имеет не более чем 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 положение, отличающееся от нее.

GTGGATCTGAGGACACTCGACGTGTTTAGCGGATGCGGCGGACTCTCCGAAG
GCTTCCACCAAGCCGGAATTTCCGACACACTCTGGGCCATTGAGATGTGGGACCCCG
CCGCTCAAGCCTTCAGACTGAATAATCCCGGCTCCACCGTGTTCACCGAGGACTGCA
ACATTCTGCTGAAGCTGGTGATGGCTGGCGAAACCACCAACTCTAGAGGCCAGAGG
CTGCCCCAGAAGGGAGATGTGGAAATGCTCTGTGGAGGCCCTCCTTGCCAAGGCTTC
TCCGGCATGAACAGGTTCAACTCTAGAACATACAGCAAGTTCAAGAACTCTCTGGTC
GTGAGCTTTCTGAGCTACTGCGACTACTATAGACCTAGGTTCTTTCTGCTGGAGAAC
GTGAGAAATTTCGTGTCCTTCAAGAGGAGCATGGTGCTGAAGCTGACACTGAGGTG
TCTGGTGAGGATGGGCTACCAGTGCACATTCGGAGTGCTGCAAGCTGGCCAGTACG
GCGTGGCCCAGACCAGAAGGAGGGCCATCATTCTGGCTGCTGCCCCCGGCGAGAAA
CTCCCTCTGTTCCCCGAGCCCCTCCACGTGTTCGCCCCTAGAGCTTGCCAGCTGAGC
GTGGTGGTCGACGATAAGAAGTTCGTGAGCAACATCACAAGGCTGTCCAGCGGACC
CTTCAGAACCATTACCGTGAGGGATACCATGTCCGACCTCCCCGAGGTGAGGAATG
GCGCCAGCGCTCTGGAGATTTCCTACAACGGCGAACCTCAGAGCTGGTTCCAAAGG
CAGCTGAGAGGCGCTCAGTATCAGCCCATTCTGAGGGACCACATCTGCAAAGATAT
GAGCGCTCTGGTGGCCGCTAGAATGAGACATATTCCTCTGGCCCCCGGCAGCGACTG
GAGAGATCTGCCCAATATTGAGGTGAGACTCAGCGACGGAACAATGGCTAGAAAAC
TGAGGTACACCCATCATGATAGAAAGAACGGAAGGAGCAGCAGCGGCGCTCTGAG
AGGAGTGTGTAGCTGCGTGGAAGCTGGCAAGGCTTGCGATCCCGCCGCTAGGCAGT
TCAATACCCTCATCCCTTGGTGTCTGCCTCACACCGGCAACAGACACAATCATTGGG
CTGGACTGTATGGAAGGCTCGAATGGGACGGCTTTTTCAGCACCACCGTGACCAATC
CCGAACCTATGGGCAAGCAAGGAAGGGTGCTCCACCCCGAGCAGCATAGAGTCGTG
TCCGTGAGAGAATGCGCTAGAAGCCAAGGCTTCCCCGACACCTATAGACTGTTCGG
CAACATTCTGGATAAGCACAGACAAGTGGGAAATGCTGTCCCTCCTCCTCTGGCCAA
GGCTATCGGACTGGAGATCAAGCTGTGTATGCTCGCCAAAGCTAGGGAGAGCGCTT
CCGCCAAGATTAAGGAGGAGGAGGCCGCCAAGGAC (SEQ ID NO: 53)

В некоторых вариантах осуществления DNMT1 для применения в полипептиде или репрессоре экспрессии, описанных в данном документе, представляет собой вариант, например содержащий одну или несколько мутаций по сравнению с последовательностью DNMT под SEQ ID NO: 20. В некоторых вариантах осуществления эффекторный домен предусматривает одну или несколько аминокислотных замен, делеций или вставок по сравнению с DNMT1 дикого типа. В некоторых вариантах осуществления полипептид представляет собой слитый белок, содержащий домен репрессора, который представляет собой или предусматривает DNMT1 и нацеливающуюся функциональную группу. В некоторых вариантах осуществления нацеливающаяся функциональная группа представляет собой или предусматривает домен по типу "цинкового пальца", домен TAL или домен CRISPR/Cas, например домен dCas9. В некоторых вариантах осуществления система репрессии экспрессии содержит два или более (например, два, три или четыре) репрессоров экспрессии, где первый репрессор экспрессии содержит эффекторную функциональную группу, предусматривающую DNMT1 или его функциональный вариант или фрагмент.

В другом аспекте настоящее изобретение направлено на репрессор экспрессии или полипептид, содержащие одну или несколько (например, одну) нацеливающихся функциональных групп и одну или несколько эффекторных функциональных групп, где одна или несколько эффекторных функциональных групп представляют собой или предусматривают комплекс DNMT3a/3L или его функциональный вариант или фрагмент. В некоторых вариантах осуществления комплекс DNMT3a/3L представляет собой слитую конструкцию. В некоторых вариантах осуществления комплекс DNMT3a/3L содержит DNMT3A, (например, DNMT3A человека) (например, такой, как в соответствии с NP_072046.2,

или белок, кодируемый NM_022552.4). В некоторых вариантах осуществления комплекс DNMT3a/3L содержит DNMT3L (например, такой, как в соответствии с NP_787063.1, или белок, кодируемый NM_175867.3). В некоторых вариантах осуществления DNMT3a/3L содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 21 или SEQ ID NO: 114. В некоторых вариантах осуществления эффекторный домен, описанный в данном документе, содержит SEQ ID NO: 21 или SEQ ID NO: 114 или последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 99 или 100% идентичностью с ней или имеет не более чем 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 положение, отличающееся от нее.

EWGPFDLVIGGSPCNDLSIVNPARKGLYEGTGRLFFEFYRLLHDARPKEGDDRPF
FWLFENVVAMGVSDKRDISRFLESNPVMIDAKEVSAAHRARYFWGNLPGMNRPLASTV
NDKLELQECLEHGRIAKFSKVRTITTRSNSIKQGKDQHFPVFMNEKEDILWCTEMERVF
GFPVHYTDVSNMSRLARQRLLGRSWSVPVIRHLFAPLKEYFACVSSGNSNANSRGPSFS
SGLVPLSLRGSHMNPLEMFETVPVWRRQPVRVLSLFEDIKKELTSLGFLESGSDPGQLKH
VVDVTDTVRKDVEEWGPFDLVYGATPPLGHTCDRPPSWYLFQFHRLLQYARPKPGSPR
PFFWMFVDNLVLNKEDLDVASRFLEMEPVTIPDVHGGSLQNAVRVWSNIPAIRSRHWA

LVSEEELSLLAQNKQSSKLAAKWPTKLVKNCFLPLREYFKYFSTELTSSL (SEQ ID NO: 21)

NHDQEFDPPKVYPPVPAEKRKPIRVLSLFDGIATGLLVLKDLGIQVDRYIASEVCE DSITVGMVRHQGKIMYVGDVRSVTQKHIQEWGPFDLVIGGSPCNDLSIVNPARKGLYEG TGRLFFEFYRLLHDARPKEGDDRPFFWLFENVVAMGVSDKRDISRFLESNPVMIDAKEV SAAHRARYFWGNLPGMNRPLASTVNDKLELQECLEHGRIAKFSKVRTITTRSNSIKQGK DQHFPVFMNEKEDILWCTEMERVFGFPVHYTDVSNMSRLARQRLLGRSWSVPVIRHLF APLKEYFACVSSGNSNANSRGPSFSSGLVPLSLRGSHMNPLEMFETVPVWRRQPVRVLS LFEDIKKELTSLGFLESGSDPGQLKHVVDVTDTVRKDVEEWGPFDLVYGATPPLGHTCD RPPSWYLFQFHRLLQYARPKPGSPRPFFWMFVDNLVLNKEDLDVASRFLEMEPVTIPDV HGGSLQNAVRVWSNIPAIRSRHWALVSEEELSLLAQNKQSSKLAAKWPTKLVKNCFLP LREYFKYFSTELTSSL (SEQ ID NO: 114)

В некоторых вариантах осуществления DNMT3a/3L кодируется нуклеотидной последовательностью под SEQ ID NO: 54. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота, описанная в данном документе, содержит последовательность под SEQ ID NO: 54 или последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 99 или 100% идентичностью с ней или имеет не более чем 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 положение, отличающееся от нее.

AACCACGACCAGGAGTTCGACCCCCCCAAGGTGTACCCCCCCGTGCCCGCCG AGAAGCGGAAGCCCATCCGGGTGCTGAGCCTGTTCGACGGCATCGCCACCGGCCTG CTGGTGCTGAAGGACCTGGGCATCCAGGTGGACCGGTACATCGCCAGCGAGGTGTG CGAGGACAGCATCACCGTGGGCATGGTGCGGCACCAGGGCAAGATCATGTACGTGG GCGACGTGCGGAGCGTGACCCAGAAGCACATCCAGGAGTGGGGCCCCTTCGACCTG GTGATCGGCGGCAGCCCCTGCAACGACCTGAGCATCGTGAACCCCGCCCGGAAGGG CCTGTACGAGGGCACCGGCCGGCTGTTCTTCGAGTTCTACCGGCTGCTGCACGACGC CCGGCCCAAGGAGGGCGACGACCGGCCCTTCTTCTGGCTGTTCGAGAACGTGGTGG CCATGGGCGTGAGCGACAAGCGGGACATCAGCCGGTTCCTGGAGAGCAACCCCGTG ATGATCGACGCCAAGGAGGTGAGCGCCGCCCACCGGGCCCGGTACTTCTGGGGCAA CCTGCCCGGCATGAACCGGCCCCTGGCCAGCACCGTGAACGACAAGCTGGAGCTGC AGGAGTGCCTGGAGCACGGCCGGATCGCCAAGTTCAGCAAGGTGCGGACCATCACC ACCCGGAGCAACAGCATCAAGCAGGGCAAGGACCAGCACTTCCCCGTGTTCATGAA CGAGAAGGAGGACATCCTGTGGTGCACCGAGATGGAGCGGGTGTTCGGCTTCCCCG TGCACTACACCGACGTGAGCAACATGAGCCGGCTGGCCCGGCAGCGGCTGCTGGGC CGGAGCTGGAGCGTGCCCGTGATCCGGCACCTGTTCGCCCCCCTGAAGGAGTACTTC GCCTGCGTGAGCAGCGGCAACAGCAACGCCAACAGCCGGGGCCCCAGCTTCAGCAG CGGCCTGGTGCCCCTGAGCCTGCGGGGCAGCCACATGAATCCTCTGGAGATGTTCGA GACAGTGCCCGTGTGGAGAAGGCAACCCGTGAGGGTGCTGAGCCTCTTCGAGGACA TTAAGAAGGAGCTGACCTCTCTGGGCTTTCTGGAATCCGGCAGCGACCCCGGCCAGC TGAAACACGTGGTGGACGTGACCGACACAGTGAGGAAGGACGTGGAAGAGTGGGG CCCCTTTGACCTCGTGTATGGAGCCACACCTCCTCTCGGCCACACATGCGATAGGCC

TCCCAGCTGGTATCTCTTCCAGTTCCACAGACTGCTCCAGTACGCCAGACCTAAGCC
CGGCAGCCCCAGACCCTTCTTCTGGATGTTCGTGGACAATCTGGTGCTGAACAAGGA
GGATCTGGATGTGGCCAGCAGATTTCTGGAGATGGAACCCGTGACAATCCCCGACG
TGCATGGCGGCTCTCTGCAGAACGCCGTGAGAGTGTGGTCCAACATCCCCGCCATTA
GAAGCAGACACTGGGCTCTGGTGAGCGAGGAGGAACTGTCTCTGCTGGCCCAGAAT
AAGCAGTCCTCCAAGCTGGCCGCCAAGTGGCCCACCAAGCTGGTGAAGAACTGCTT
TCTGCCTCTGAGGGAGTATTTCAAGTATTTCAGCACCGAACTGACCAGCAGCCTG
(SEQ ID NO: 54)

В некоторых вариантах осуществления DNMT3a/3L для применения в полипептиде или репрессоре экспрессии, описанных в данном документе, представляет собой вариант, например содержащий одну или несколько мутаций по сравнению с DNMT3a/3L под SEQ ID NO: 21 или SEQ ID NO: 114. В некоторых вариантах осуществления вариант DNMT3a/3L предусматривает одну или несколько аминокислотных замен, делеций или вставок по сравнению с SEQ ID NO: 21 или SEQ ID NO: 114. В некоторых вариантах осуществления полипептид или репрессор экспрессии представляет собой слитый белок, содержащий эффекторную функциональную группу, которая представляет собой или предусматривает DNMT3a/3L, и нацеливающуюся функциональную группу. В некоторых вариантах осуществления нацеливающаяся функциональная группа представляет собой или предусматривает домен по типу "цинкового пальца", домен TAL или домен CRISPR/Cas, например домен dCas9. В некоторых вариантах осуществления система репрессии экспрессии содержит два или более (например, два, три или четыре) репрессоров экспрессии, где первый репрессор экспрессии содержит эффекторную функциональную группу, предусматривающую DNMT3a/3L или его функциональный вариант или фрагмент.

В некоторых вариантах осуществления эффекторная функциональная группа представляет собой или предусматривает полипептид. В некоторых вариантах осуществления эффекторная функциональная группа представляет собой или предусматривает нуклеиновую кислоту. В некоторых вариантах осуществления эффекторная функциональная группа представляет собой химическое вещество, например химическое вещество, которое модулирует цитозин I или аденин (A) (например, бисульфит натрия, бисульфит аммония). В некоторых вариантах осуществления эффекторная функциональная группа обладает ферментативной активностью (например, активностью метилтрансферазы, деметилазы, нуклеазы (например, Cas9) или дезаминазы). Эффекторная функциональная группа может представлять собой или предусматривать одну или несколько малых молекул, пептидов, нуклеиновых кислот, наночастиц, аптамеров или фармакологических средств с плохой PK/PD.

В некоторых вариантах осуществления эффекторная функциональная группа может предусматривать пептидный лиганд, полноразмерный белок, фрагмент белка, антитело, фрагмент антитела и/или нацеливающийся аптамер. В некоторых вариантах осуществления белок может связываться с рецептором, таким как внеклеточный рецептор,

нейропептид, гормональный пептид, пептидное лекарственное средство, токсичный пептид, вирусный или микробный пептид, синтетический пептид или пептид-агонист либо пептид-антагонист.

В некоторых вариантах осуществления эффекторная функциональная группа может предусматривать антигены, антитела, фрагменты антител, такие как, например, однодоменные антитела, лиганды или рецепторы, такие как, например, глюкагоноподобный пептид 1 (GLP-1), рецептор 2 GLP-2, рецептор холецистокинина B (CCKB) или соматостатина, пептидные терапевтические средства, такие как, например, терапевтические средства, которые связываются с определенными рецепторами клеточной поверхности, такими как рецепторы, сопряженные с G-белком (GPCR), или ионные каналы, синтетические пептиды или пептиды-аналоги из природных биологически активных пептидов, противомикробные пептиды, порообразующие пептиды, пептиды, целенаправленно воздействующие на опухоль, или цитотоксические пептиды, или пептиды, индуцирующие разрушение или самоуничтожение, такие как сигнальный пептид, индуцирующий апоптоз, или фотосенсибилизирующий пептид.

Пептидные или белковые функциональные группы для применения в эффекторных функциональных группах, как описано в данном документе, могут также включать малые антигенсвязывающие пептиды, например антигенсвязывающее антитело или антителоподобные фрагменты, такие как, например, одноцепочечные антитела, нанотела (см., например, Steeland et al. 2016. Nanobodies as therapeutics: big opportunities for small antibodies. Drug Discov Today: 21(7):1076-113). Такие малые антигенсвязывающие пептиды могут связывать, например, цитозольный антиген, ядерный антиген, внутриорганелльный антиген.

В некоторых вариантах осуществления эффекторная функциональная группа содержит доминантно-негативный компонент (например, доминантно-негативную функциональную группу), например белок, который распознает и связывает последовательность (например, якорную последовательность, например мотив связывания CTCF), но с неактивным (например, мутантным) доменом димеризации, например доменом димеризации, который не способен образовывать функциональное объединение, опосредованное якорной последовательностью), или связывается с компонентом геномного комплекса (например, субъединицей фактора транскрипции и т. д.), предотвращая образование функционального фактора транскрипции и т. д. Например, домен по типу "цинкового пальца" CTCF можно быть изменен так, что он связывает специфическую якорную последовательность (путем добавления "цинковых пальцев", которые распознают фланкирующие нуклеиновые кислоты), в то время как домен гомодимеризации изменен для предотвращения взаимодействия между сконструированным CTCF и эндогенными формами CTCF. В некоторых вариантах осуществления доминантно-негативный компонент содержит синтетический нуклеирующий полипептид с выбранной аффинностью связывания с якорной последовательностью в пределах объединения, опосредованного якорной

последовательностью-мишенью. В некоторых вариантах осуществления аффинность связывания может составлять по меньшей мере 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или выше или ниже аффинности связывания эндогенного нуклеирующего полипептида (например, CTCF), который ассоциируется с якорной последовательностью-мишенью. Синтетический нуклеирующий полипептид может характеризоваться 30-90%, 30-85%, 30-80%, 30-70%, 50-80%, 50-90% идентичностью аминокислотной последовательности с соответствующим эндогенным нуклеирующим полипептидом. Нуклеирующий полипептид может модулировать (например, разрушать), например посредством конкурентного связывания, например конкурируя со связыванием эндогенного нуклеирующего полипептида с его якорной последовательностью.

В некоторых вариантах осуществления эффекторная функциональная группа предусматривает антитело или его фрагмент. В некоторых вариантах осуществления экспрессия гена-мишень (например, MYC) изменяется при использовании эффекторных функциональных групп, которые представляют собой или предусматривают одно или несколько антител или их фрагментов. В некоторых вариантах осуществления экспрессия гена изменяется при использовании эффекторных функциональных групп, которые представляют собой или предусматривают одно или несколько антител (или их фрагментов) и dCas9.

В некоторых вариантах осуществления антитело или его фрагмент для применения в эффекторной функциональной группе могут быть моноклональными. Антитело может быть слитой молекулой, химерным антителом, негуманизированным антителом, частично или полностью гуманизированным антителом и т. д. Как будет понятно специалисту в данной области, применяемый формат антитела может быть одинаковым или различаться в зависимости от заданной мишени.

В некоторых вариантах осуществления эффекторная функциональная группа предусматривает нуклеирующую молекулу, образующую объединение, нуклеиновую кислоту, кодирующую нуклеирующую молекулу, образующую объединение, или их комбинацию. Нуклеирующая молекула, образующая объединение, может представлять собой, например, CTCF, когезин, USF1, YY1, фактор 3, ассоциированный с TATA-бокс-связывающим белком (TAF3), ZNF143-связывающий мотив или другой полипептид, который способствует образованию объединения, опосредованного якорной последовательностью. Нуклеирующая молекула, образующая объединение, может представлять собой эндогенный полипептид или другой белок, такой как фактор транскрипции, например, аутоиммунный регулятор (AIRE), другой фактор, например X-инактивирующий специфический транскрипт (XIST), или сконструированный полипептид, который сконструирован для распознавания представляющей интерес конкретной последовательности ДНК, например, имеющей "цинковый палец", лейциновую застежку или домен bHLH для распознавания последовательности. Нуклеирующая молекула, образующая объединение, может модулировать взаимодействия

ДНК внутри или вокруг объединения, опосредованного якорной последовательностью (например, ассоциированного или содержащего элемент геномной последовательности, являющийся мишенью для нацеливающейся функциональной группы). Например, нуклеирующая молекула, образующая объединение, может рекрутировать другие факторы к якорной последовательности, что изменяет степень образования или разрушения объединения, опосредованное якорной последовательностью.

Нуклеирующая молекула, образующая объединение, может также содержать домен димеризации для гомо- или гетеродимеризации. Одна или несколько нуклеирующих молекул, образующих объединение, например эндогенных и сконструированных, могут взаимодействовать с образованием объединения, опосредованного якорной последовательностью. В некоторых вариантах осуществления нуклеирующая молекула, образующая объединение, сконструирована так, чтобы дополнительно включать стабилизирующий домен, например домен когезионного взаимодействия, для стабилизации объединения, опосредованного якорной последовательностью. В некоторых вариантах осуществления нуклеирующая молекула, образующая объединение, сконструирована для связывания последовательности-мишени, например модулирует аффинность связывания последовательности-мишени. В некоторых вариантах осуществления нуклеирующая молекула, образующая объединение, выбрана или сконструирована с выбранной аффинностью связывания с якорной последовательностью в пределах объединения, опосредованного якорной последовательностью.

Нуклеирующие молекулы, образующие объединение, и их соответствующие якорные последовательности могут быть идентифицированы с применением клеток, несущих инактивирующие мутации в CTCF, и способов захвата хромосомной конформации или 3C-способов, например Hi-C- или высокопроизводительного секвенирования, для исследования топологически ассоциированных доменов, например топологических взаимодействий между дистальными областями ДНК или локусами в отсутствие CTCF. Также могут быть идентифицированы дальнодействующие взаимодействия ДНК. Дополнительные анализы могут включать ChIA-PET-анализ с применением приманки, такой как когезин, YY1 или USF1, ZNF143-связывающего мотива и MS для идентификации комплексов, ассоциированных с приманкой.

В некоторых вариантах осуществления эффекторная функциональная группа предусматривает ДНК-связывающий домен белка. В некоторых вариантах осуществления ДНК-связывающий домен эффекторной функциональной группы усиливает или изменяет целенаправленное воздействие модулирующего средства, но сам по себе не обеспечивает полного целенаправленного воздействия модулирующим средством (например, нацеливающаяся функциональная группа по-прежнему необходима для достижения целенаправленного воздействия модулирующего средства). В некоторых вариантах осуществления ДНК-связывающий домен усиливает целенаправленное воздействие модулирующего средства. В некоторых вариантах осуществления ДНК-связывающий домен усиливает эффективность модулирующего средства. ДНК-связывающие белки

содержат различные структурные мотивы, например, мотивы, которые играют ключевую роль в связывании ДНК, известные специалистам в данной области. В некоторых вариантах осуществления ДНК-связывающий домен содержит мотив спираль-поворот-спираль (HTH), общий мотив распознавания ДНК в белках-репрессорах. Такой мотив содержит две спирали, одна из которых распознает ДНК (она же спираль распознавания), при этом боковые цепи обеспечивают специфичность связывания. Такие мотивы обычно применяют для регуляции белков, участвующих в процессах развития. Иногда за одну и ту же последовательность конкурируют более одного белка, или белки распознают один и тот же фрагмент ДНК. Различные белки могут различаться по своей аффинности к одной и той же последовательности или конформации ДНК соответственно за счет Н-связей, солевых мостиков и ван-дер-ваальсовых взаимодействий.

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

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

В некоторых вариантах осуществления ДНК-связывающий домен содержит мотив лейциновой застежки. В некоторых факторах транскрипции сайт связывания димера с ДНК образует лейциновую застежку. Этот мотив предусматривает две амфипатические спирали, по одной от каждой субъединицы, взаимодействующие друг с другом с образованием в результате супервторичной структуры с левосторонней суперспиралью. Лейциновая застежка представляет собой переплетение регулярно расположенных остатков лейцина в одной спирали с лейцинами из прилегающей спирали. В основном спирали, участвующие в лейциновых застежках, имеют гептадную последовательность (abcdefg) с остатками a и d, являющимися гидрофобными, и другими остатками являющимися гидрофильными. Мотивы лейциновой застежки могут опосредовать образование как гомо-, так и гетеродимеров.

В некоторых вариантах осуществления ДНК-связывающий домен предусматривает домен по типу "Zn-пальца", где ион Zn++ координируется 2 остатками Cys и 2 остатками His. Такой фактор транскрипции предусматривает тример со стехиометрией ββ ‘α. Очевидным эффектом координации Zn++ является стабилизация небольшой комплексной структуры вместо остатков гидрофобного ядра. Каждый "Zn-палец" конформационно

идентично взаимодействует с последовательными сегментами пар тройных оснований в большой бороздке двойной спирали. Взаимодействие белок-ДНК определяется двумя факторами: (i) H-связывающее взаимодействие между α-спиралью и сегментом ДНК, в основном между остатками Arg и основаниями гуанина. (ii) взаимодействие H-связей с фосфатным остовом ДНК, в основном с Arg и His. Альтернативный мотив "Zn-пальца" хелатирует Zn++ с помощью 6 Cys.

В некоторых вариантах осуществления ДНК-связывающий домен предусматривает TATA-бокс-связывающий белок (TBP). TBP был впервые идентифицирован как компонент инициирующего фактора TFIID II класса. Такие связывающие белки участвуют в транскрипции всеми тремя ядерными РНК-полимеразами, выступая в качестве субъединицы каждой из них. В структуре TBP видны два α/β структурных домена из 89-90 аминокислот. С-концевая или коровая область TBP с высокой аффинностью связывается с консенсусной последовательностью TATA (TATAa/tAa/t, SEQ ID NO: 210), распознавая детерминанты малой бороздки и способствуя изгибу ДНК. TBP напоминают молекулярное седло. Сторона связывания выстлана центральными 8 нитями 10-нитевого антипараллельного β-листа. Верхняя поверхность содержит четыре α-спирали и связывается с различными компонентами механизма транскрипции.

В некоторых вариантах осуществления ДНК-связывающий домен представляет собой или предусматривает фактор транскрипции. Факторы транскрипции (TF) могут быть модульными белками, содержащими ДНК-связывающий домен, который отвечает за специфическое распознавание последовательностей оснований, и один или несколько эффекторных доменов, которые могут активировать или репрессировать транскрипцию. TF взаимодействуют с хроматином и рекрутируют белковые комплексы, которые служат коактиваторами или корепрессорами.

В некоторых вариантах осуществления эффекторная функциональная группа содержит одну или несколько РНК (например, gRNA) и dCas9. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько РНК нацеливаются на элемент геномной последовательности посредством dCas9 и специфичной к мишени направляющей РНК. Как будет понятно специалисту в данной области, РНК, применяемые для нацеливания, могут быть одинаковыми или отличающимися в зависимости от заданной мишени. Эффекторная функциональная группа может содержать аптамер, такой как олигонуклеотидный аптамер или пептидный аптамер. Аптамерные компоненты представляют собой олигонуклеотидные или пептидные аптамеры.

Эффекторная функциональная группа может содержать олигонуклеотидный аптамер. Олигонуклеотидные аптамеры представляют собой однонитевые молекулы ДНК или РНК (ssDNA или ssRNA), которые могут связываться с предварительно выбранными мишенями, в том числе белками и пептидами, с высокой аффинностью и специфичностью.

Олигонуклеотидные аптамеры представляют собой молекулы нуклеиновых кислот, которые могут быть сконструированы в ходе повторных циклов отбора in vitro или, что

эквивалентно, SELEX (систематической эволюции лигандов экспоненциальным обогащением) для связывания с различными молекулярными мишенями, такими как малые молекулы, белки, нуклеиновые кислоты и даже клетки, ткани и организмы. Аптамеры обеспечивают дифференциальное молекулярное распознавание и могут быть получены с помощью химического синтеза. Кроме того, аптамеры обладают предпочтительными свойствами хранения и вызывают незначительную иммуногенность или не вызывают ее в терапевтических путях применения.

Как ДНК-, так и РНК-аптамеры демонстрируют устойчивую аффинность связывания с различными мишенями. Например, ДНК- и РНК-аптамеры были выбраны для лизоцима, тромбина, транс-действующего элемента ответа вируса иммунодефицита человека (HIV TAR), гемина, интерферона γ, фактора роста эндотелия сосудов (VEGF), простатического специфического антигена (PSA), дофамина и неклассического онкогена фактора теплового шока 1 (HSF1).

Диагностические методики для определения профиля аптамерных белков плазмы крови включают протеомику аптамеров плазмы крови. Данная методика позволит в будущем проводить измерения белков с использованием нескольких биомаркеров, что поможет диагностике отличить заболевание от здорового состояния.

Эффекторная функциональная группа может содержать функциональную группу в форме пептидного аптамера. Пептидные аптамеры имеют один короткий вариабельный пептидный домен (или несколько их), включая пептиды, имеющие низкую молекулярную массу 12-14 кДа. Пептидные аптамеры могут быть разработаны для специфичного связывания и препятствования белок-белковым взаимодействиям внутри клеток.

Пептидные аптамеры представляют собой искусственные белки, выбранные или сконструированные для связывания специфических молекул-мишеней. Эти белки содержат один или несколько пептидных комплексов с вариабельной последовательностью. В типичном случае их выделяют из комбинаторных библиотек и затем часто улучшают посредством направленной мутации или циклов мутагенеза и отбора вариабельных областей. In vivo пептидные аптамеры могут связывать клеточные белки-мишени и вызывать биологические эффекты, в том числе препятствование нормальным белковым взаимодействиям своих молекул-мишеней с другими белками. В частности, вариабельный комплекс пептидного аптамера, присоединенный к связывающему домену фактора транскрипции, подвергают скринингу при взаимодействии с белком-мишенью, присоединенным к активирующему домену фактора транскрипции. Связывание пептидного аптамера со своей мишенью in vivo при применении данной стратегии отбора выявляют в виде экспрессии нижерасположенного маркерного гена дрожжей. В таких экспериментах идентифицируют конкретные белки, связываемые аптамерами, и белковые взаимодействия, которые аптамеры нарушают, обуславливающие заданный фенотип. Кроме того, пептидные аптамеры, дериватизированные с помощью соответствующих функциональных компонентов, могут вызывать специфическую посттрансляционную модификацию своих белков-мишеней или

изменение субклеточной локализации мишеней. Пептидные аптамеры также могут распознавать мишени in vitro. Они нашли применение вместо антител в биосенсорах, и их применяли для выявления активных изоформ белков в популяциях, содержащих как неактивные, так и активные формы белков. Производные, известные как "головастики", в которых пептидные аптамерные "головки" ковалентно связаны с "хвостами" на основе двухнитевой ДНК с уникальной последовательностью, обеспечивают возможность проведения количественной оценки немногочисленных молекул-мишеней в смесях с помощью ПЦР (с помощью, например, количественной полимеразной цепной реакции в режиме реального времени) в отношении их ДНК-"хвостов".

Отбор пептидных аптамеров можно производить с помощью различных систем, однако в настоящее время наиболее часто применяемой является дрожжевая двугибридная система. Пептидные аптамеры также могут быть отобраны из комбинаторных библиотек пептидов, сконструированных с помощью фагового дисплея и других технологий поверхностного дисплея, таких как мРНК-дисплей, рибосомный дисплей, бактериальный дисплей и дрожжевой дисплей. Эти экспериментальные процедуры известны также как биопэннинг. Среди пептидов, полученных в результате биопэннинга, мимеотопы могут рассматриваться в качестве типа пептидных аптамеров. Пептиды, отобранные с помощью пэннинга из комбинаторных библиотек пептидов, сохраняли в специальной базе данных под названием MimoDB.

Иллюстративная эффекторная функциональная группа может предусматривать без ограничения убиквитин, бициклические пептиды в качестве ингибиторов убиквитинлигазы, факторы транскрипции, ферменты модификации ДНК и белка, такие как топоизомеразы, ингибиторы топоизомеразы, такие как топотекан, ДНК-метилтрансферазы, такие как семейство DNMT (например, DNMT3A, DNMT3B, DNMT3a/3L, MQ1), протеинметилтрансферазы (например, вирусная лизинметилтрансфераза (vSET), протеинлизин-N-метилтрансфераза (SMYD2), деаминазы (например, APOBEC, UG1), гистонметилтрансферазы, такие как энхансер гомолога 2 zeste (EZH2), PRMT1, гистонлизин-N-метилтрансферазу (Setdb1), гистонметилтрансферазу (SET2), эухроматическую гистонлизин-N-метилтрансферазу 2 (G9A), гистонлизин-N-метилтрансферазу (SUV39H1) и G9a), гистондеацетилазу (например, HDAC1, HDAC2, HDAC3), ферменты, играющие роль в деметилировании ДНК (например, ферменты семейства TET катализируют окисление 5-метилцитозина в 5-гидроксиметилцитозин и более высокие окислительные производные), протеиндеметилазы, такие как KDM1A и лизинспецифическая гистондеметилаза 1 (LSD1), геликазы, такие как DHX9, деацетилазы (например, сиртуин 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7), киназы, фосфатазы, ДНК-интеркалирующие средства, такие как бромид этидия, SYBR зеленый и профлавин, ингибиторы эффлюксного насоса, такие как пептидомиметики, подобные фенилаланин-аргинил-β-нафтиламиду или производным хинолина, активаторы и ингибиторы ядерных рецепторов, ингибиторы протеасом, конкурентные ингибиторы ферментов, таких как те, которые участвуют в лизосомных болезнях накопления, ингибиторы синтеза белков, нуклеазы

(например, Cpf1, Cas9, нуклеаза с "цинковыми пальцами"), определенные домены из белков, такие как домен KRAB, и продукты слияния одного или нескольких из них (например, dCas9-DNMT, dCas9-MQ1, dCas9-KRAB).

В некоторых вариантах осуществления кандидатный домен может быть определен как подходящий для применения в качестве эффекторной функциональной группы посредством способов, известных специалистам в данной области. Например, кандидатную эффекторную функциональную группу можно протестировать путем анализа того, снижает ли кандидатная эффекторная функциональная группа уровень экспрессии гена-мишени в клетке, например снижает ли уровень транскрипта РНК, кодируемого геном-мишенью (например, при измерении посредством RNASeq или нозерн-блоттинга), или снижает ли уровень белка, кодируемого геном-мишенью (например, при измерении посредством ELISA), при наличии кандидатной эффекторной функциональной группы в ядре клетки и надлежащей ее локализации (например, в гене-мишени или элементе контроля транскрипции, функционально связанном с указанным геном-мишенью, например посредством нацеливающейся функциональной группы).

В некоторых вариантах осуществления репрессор экспрессии содержит множество эффекторных функциональных групп, где каждая эффекторная функциональная группа не связывается выявляемым образом, например не связывается, с другой эффекторной функциональной группой. В некоторых вариантах осуществления система репрессии экспрессии содержит первый репрессор экспрессии, содержащий первую эффекторную функциональную группу, и второй репрессор экспрессии, содержащий вторую эффекторную функциональную группу, где первая эффекторная функциональная группа не связывается выявляемым образом, например не связывается, со второй эффекторной функциональной группой.

В некоторых вариантах осуществления система репрессии экспрессии содержит множество репрессоров экспрессии, где каждый представитель из множества репрессоров экспрессии содержит эффекторную функциональную группу, где каждая эффекторная функциональная группа не связывается выявляемым образом, например не связывается, с другой эффекторной функциональной группой. В некоторых вариантах осуществления система репрессии экспрессии содержит первый репрессор экспрессии, содержащий первую эффекторную функциональную группу, и второй репрессор экспрессии, содержащий вторую эффекторную функциональную группу, где первая эффекторная функциональная группа не связывается выявляемым образом, например не связывается, со второй эффекторной функциональной группой. В некоторых вариантах осуществления система репрессии экспрессии содержит первый репрессор экспрессии, содержащий первую эффекторную функциональную группу, и второй репрессор экспрессии, содержащий вторую эффекторную функциональную группу, где первая эффекторная функциональная группа не связывается выявляемым образом, например не связывается, с другой первой эффекторной функциональной группой, и вторая эффекторная функциональная группа не связывается выявляемым образом, например не связывается, с

другой второй эффекторной функциональной группой. В некоторых вариантах осуществления эффекторная функциональная группа для применения в композициях и способах, описанных в данном документе, является функциональной в мономерном состоянии, например отличном от димерного.

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

Эпигенетические модифицирующие функциональные группы, применимые в способах и композициях по настоящему изобретению, предусматривают средства, которые влияют на эпигенетические маркеры, например для метилирования ДНК, метилирования гистонов, ацетилирования гистонов, сумоилирования гистонов, фосфорилирования гистонов и РНК-ассоциированного сайленсинга. Иллюстративные эпигенетические ферменты, которые могут являться мишенью для элемента геномной последовательности, который описан в данном документе, предусматривают ДНК-метилазы (например, DNMT3a, DNMT3b, DNMT3a/3L, MQ1), ферменты деметилирования ДНК (например, семейство TET), гистонметилтрансферазы, гистондеацетилазу (например, HDAC1, HDAC2, HDAC3), сиртуин 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7, лизинспецифическую гистондеметилазу 1 (LSD1), гистонлизин-N-метилтрансферазу (Setdb1), эухроматическую гистонлизин-N-метилтрансферазу 2 (G9a), гистонлизин-N-метилтрансферазу (SUV39H1), энхансер гомолога zeste 2 (EZH2), вирусную лизинметилтрансферазу (vSET), гистонметилтрансферазу (SET2) и протеинлизин-N-метилтрансферазу (SMYD2). Примеры таких эпигенетических модифицирующих средств описаны, например, в de Groote et al. Nuc. Acids Res. (2012):1-18.

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

В некоторых вариантах осуществления эффекторная функциональная группа содержит компонент системы редактирования генов, например домен CRISPR/Cas, например домен по типу "Zn-пальца", например эффекторный домен TAL. В некоторых вариантах осуществления эпигенетическая модифицирующая функциональная группа может содержать полипептид (например, пептидную или белковую функциональную группу), связанный с gRNA, и нуклеазу-мишень, например Cas9, например Cas9 дикого

типа, никазу Cas9 (например, Cas9 D10A), каталитически неактивный Cas9 (dCas9), eSpCas9, Cpf1, C2C1 или C2C3 или нуклеиновую кислоту, кодирующую такую нуклеазу.

Как используется в данном документе, "биологически активная часть эффекторного домена" представляет собой часть, которая сохраняет функцию (например, полностью, частично, минимально) эффекторного домена (например, "минимальный" или "коровый" домен). В некоторых вариантах осуществления в результате слияния dCas9 со всеми или частью одного или нескольких эффекторных доменов эпигенетического модифицирующего средства (такого как ДНК-метилаза или фермент, играющий роль в деметилировании ДНК, например DNMT3a, DNMT3b, DNMT3L, ингибитор DNMT, их комбинации, ферменты семейства TET, протеинацетилтрансфераза или деацетилаза, dCas9-DNMT3a/3L, dCas9-DNMT3a/3L/KRAB, dCas9/VP64) образуется химерный белок, который связан с полипептидом и применим в способах, описанных в данном документе. Эффекторная функциональная группа, содержащая такой химерный белок, называется либо генетической модифицирующей функциональной группой (по причине применения в ней компонента системы редактирования генов, Cas9), либо эпигенетической модифицирующей функциональной группой (по причине применения в ней эффекторного домена эпигенетического модифицирующего средства).

В некоторых вариантах осуществления представленные технологии описаны как предусматривающие gRNA, которая специфически целенаправленно воздействует на ген-мишень. В некоторых вариантах осуществления ген-мишень представляет собой онкоген, супрессор опухоли или ген, связанный с нарушением, представляющим собой неправильную регуляцию MYC. В некоторых вариантах осуществления ген-мишень представляет собой MYC.

В некоторых вариантах осуществления технологии, представленные в данном документе, включают способы доставки субъекту одной или нескольких генетически модифицирующих функциональных групп (например, компонентов системы CRISPR), описанных в данном документе, например в ядро клетки или ткань субъекта, путем связывания такой функциональной группы с нацеливающейся функциональной группой в качестве части слитой молекулы. В некоторых вариантах осуществления методики, представленные в данном документе, включают способы доставки одной или нескольких генетически модифицирующих функциональных групп (например, компонентов системы CRISPR), описанных в данном документе, субъекту, например в ядро клетки или ткань субъекта, путем инкапсулирования одной или нескольких генетических модифицирующих функциональных групп (например, компонентов системы CRISPR) в липидной наночастице.

Дополнительные функциональные группы

Репрессор экспрессии может дополнительно содержать одну или несколько дополнительных функциональных групп (например, в дополнение к одной или нескольким нацеливающимся функциональным группам и одной или нескольким эффекторным функциональным группам). В некоторых вариантах осуществления

дополнительная функциональная группа выбрана из меченой или контрольной функциональной группы, расщепляемой функциональной группы (например, расщепляемой функциональной группы, расположенной между функциональной группой, целенаправленно воздействующей на ДНК, и эффекторной функциональной группой или на N- или С-концевой части полипептида), малой молекулы, полипептида, перемещающегося через мембрану, или функциональной группы фармакологического средства.

Иллюстративные репрессоры экспрессии

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

В некоторых вариантах осуществления репрессор экспрессии содержит нацеливающуюся функциональную группу, содержащую dCas9, например dCas9 S. aureus, и эффекторную функциональную группу, содержащую MQ1, например бактериальный MQ1. В некоторых вариантах осуществления репрессор экспрессии кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 68 (например, нуклеиновая кислота (например, cDNA), кодирующая репрессор экспрессии). В некоторых вариантах осуществления репрессор экспрессии кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 119. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота, описанная в данном документе, содержит последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 68, 119 или последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 99 или 100% идентичностью с ней или имеет не более чем 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 положение, отличающееся от нее.

Нуклеотидная последовательность dCas9-MQ1:

GAGTTCGTGTACGGCGACTACAAGGTGTACGACGTGCGGAAGATGATCGCCA
AGAGCGAGCAGGAGATCGGCAAGGCCACCGCCAAGTACTTCTTCTACAGCAACATC
ATGAACTTCTTCAAGACCGAGATCACCCTGGCCAACGGCGAGATCCGGAAGCGGCC
CCTGATCGAGACCAACGGCGAGACCGGCGAGATCGTGTGGGACAAGGGCCGGGACT
TCGCCACCGTGCGGAAGGTGCTGAGCATGCCCCAGGTGAACATCGTGAAGAAAACC
GAGGTGCAGACCGGCGGCTTCAGCAAGGAGAGCATCCTGCCCAAGCGGAACAGCG
ACAAGCTGATCGCCCGGAAGAAGGACTGGGACCCCAAGAAGTACGGCGGCTTCGAC
AGCCCCACCGTGGCCTACAGCGTGCTGGTGGTGGCCAAGGTGGAGAAGGGCAAGAG
CAAGAAGCTGAAATCCGTGAAGGAGCTGCTGGGCATCACCATCATGGAGCGGAGCA
GCTTCGAGAAGAACCCCATCGACTTCCTGGAGGCCAAGGGCTACAAGGAGGTGAAG
AAGGACCTGATCATCAAGCTGCCCAAGTACAGCCTGTTCGAGCTGGAGAACGGCCG
GAAGCGGATGCTGGCCAGCGCCGGCGAGCTGCAGAAGGGCAACGAGCTGGCCCTGC
CCAGCAAGTACGTGAACTTCCTGTACCTGGCCAGCCACTACGAGAAGCTGAAGGGC
AGCCCCGAGGACAACGAGCAGAAGCAGCTGTTCGTGGAGCAGCACAAGCACTACCT
GGACGAGATCATCGAGCAGATCAGCGAGTTCAGCAAGCGGGTGATCCTGGCCGACG
CCAACCTGGACAAGGTGCTGAGCGCCTACAACAAGCACCGGGACAAGCCCATCCGG

GAGCAGGCCGAGAACATCATCCACCTGTTCACCCTGACCAACCTGGGCGCCCCCGC
CGCCTTCAAGTACTTCGACACCACCATCGACCGGAAGCGGTACACCAGCACCAAGG
AGGTGCTGGACGCCACCCTGATCCACCAGAGCATCACCGGCCTGTACGAGACCCGG
ATCGACCTGAGCCAGCTGGGCGGCGACAAGCGGCCCGCCGCCACCAAGAAGGCCGG
CCAGGCCAAGAAGAAGAAGGCCCGGGACAGCAAGGTGGAGAACAAGACCAAGAAG
CTGCGGGTGTTCGAGGCCTTCGCCGGCATCGGCGCCCAGCGGAAGGCCCTGGAGAA
GGTGCGGAAGGACGAGTACGAGATCGTGGGCCTGGCCGAGTGGTACGTGCCCGCCA
TCGTGATGTACCAGGCCATCCACAACAACTTCCACACCAAGCTGGAGTACAAGAGC
GTGAGCCGGGAGGAGATGATCGACTACCTGGAGAACAAGACCCTGAGCTGGAACA
GCAAGAACCCCGTGAGCAACGGCTACTGGAAGCGGAAGAAGGACGACGAGCTGAA
GATCATCTACAACGCCATCAAGCTGAGCGAGAAGGAGGGCAACATCTTCGACATCC
GGGACCTGTACAAGCGGACCCTGAAGAACATCGACCTGCTGACCTACAGCTTCCCCT
GCCAGGACCTGAGCCAGCAGGGCATCCAGAAGGGCATGAAGCGGGGCAGCGGCAC
CCGGAGCGGCCTGCTGTGGGAGATCGAGCGGGCCCTGGACAGCACCGAGAAGAAC
GACCTGCCCAAGTACCTGCTGATGGAGAACGTGGGCGCCCTGCTGCACAAGAAGAA
CGAGGAGGAGCTGAACCAGTGGAAGCAGAAGCTGGAGAGCCTGGGCTACCAGAAC
AGCATCGAGGTGCTGAACGCCGCCGACTTCGGCAGCAGCCAGGCCCGGCGGCGGGT
GTTCATGATCAGCACCCTGAACGAGTTCGTGGAGCTGCCCAAGGGCGACAAGAAGC
CCAAGAGCATCAAGAAGGTGCTGAACAAGATCGTGAGCGAGAAGGACATCCTGAA
CAACCTGCTGAAGTACAACCTGACCGAGTTCAAGAAAACCAAGAGCAACATCAACA
AGGCCAGCCTGATCGGCTACAGCAAGTTCAACAGCGAGGGCTACGTGTACGACCCC
GAGTTCACCGGCCCCACCCTGACCGCCAGCGGCGCCAACAGCCGGATCAAGATCAA
GGACGGCAGCAACATCCGGAAGATGAACAGCGACGAGACCTTCCTGTACATCGGCT
TCGACAGCCAGGACGGCAAGCGGGTGAACGAGATCGAGTTCCTGACCGAGAACCAG
AAGATCTTCGTGTGCGGCAACAGCATCAGCGTGGAGGTGCTGGAGGCCATCATCGA
CAAGATCGGCGGCCCCAGCAGCGGCGGCAAGCGGCCCGCCGCCACCAAGAAGGCC
GGCCAGGCCAAGAAGAAGAAGGGCAGCTACCCCTACGACGTGCCCGACTACGCCTG
AGCGGCCGCTTAATTAAGCTGCCTTCTGCGGGGCTTGCCTTCTGGCCATGCCCTTCTT
CTCTCCCTTGCACCTGTACCTCTTGGTCTTTGAATAAAGCCTGAGTAGGAAGTCTAG
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA (SEQ ID NO: 68)

AAGGAAATAAGAGAGAAAAGAAGAGTAAGAAGAAATATAAGAGCCACCAT
GGCCCCCAAGAAGAAGCGGAAGGTGGGCATCCACGGCGTGCCCGCCGCCGACAAG
AAGTACAGCATCGGCCTGGCCATCGGCACCAACAGCGTGGGCTGGGCCGTGATCAC
CGACGAGTACAAGGTGCCCAGCAAGAAGTTCAAGGTGCTGGGCAACACCGACCGGC
ACAGCATCAAGAAGAACCTGATCGGCGCCCTGCTGTTCGACAGCGGCGAGACCGCC
GAGGCCACCCGGCTGAAGCGGACCGCCCGGCGGCGGTACACCCGGCGGAAGAACC
GGATCTGCTACCTGCAGGAGATCTTCAGCAACGAGATGGCCAAGGTGGACGACAGC
TTCTTCCACCGGCTGGAGGAGAGCTTCCTGGTGGAGGAGGACAAGAAGCACGAGCG
GCACCCCATCTTCGGCAACATCGTGGACGAGGTGGCCTACCACGAGAAGTACCCCA

CCATCTACCACCTGCGGAAGAAGCTGGTGGACAGCACCGACAAGGCCGACCTGCGG
CTGATCTACCTGGCCCTGGCCCACATGATCAAGTTCCGGGGCCACTTCCTGATCGAG
GGCGACCTGAACCCCGACAACAGCGACGTGGACAAGCTGTTCATCCAGCTGGTGCA
GACCTACAACCAGCTGTTCGAGGAGAACCCCATCAACGCCAGCGGCGTGGACGCCA
AGGCCATCCTGAGCGCCCGGCTGAGCAAGAGCCGGCGGCTGGAGAACCTGATCGCC
CAGCTGCCCGGCGAGAAGAAGAACGGCCTGTTCGGCAACCTGATCGCCCTGAGCCT
GGGCCTGACCCCCAACTTCAAGAGCAACTTCGACCTGGCCGAGGACGCCAAGCTGC
AGCTGAGCAAGGACACCTACGACGACGACCTGGACAACCTGCTGGCCCAGATCGGC
GACCAGTACGCCGACCTGTTCCTGGCCGCCAAGAACCTGAGCGACGCCATCCTGCTG
AGCGACATCCTGCGGGTGAACACCGAGATCACCAAGGCCCCCCTGAGCGCCAGCAT
GATCAAGCGGTACGACGAGCACCACCAGGACCTGACCCTGCTGAAGGCCCTGGTGC
GGCAGCAGCTGCCCGAGAAGTACAAGGAGATCTTCTTCGACCAGAGCAAGAACGGC
TACGCCGGCTACATCGACGGCGGCGCCAGCCAGGAGGAGTTCTACAAGTTCATCAA
GCCCATCCTGGAGAAGATGGACGGCACCGAGGAGCTGCTGGTGAAGCTGAACCGGG
AGGACCTGCTGCGGAAGCAGCGGACCTTCGACAACGGCAGCATCCCCCACCAGATC
CACCTGGGCGAGCTGCACGCCATCCTGCGGCGGCAGGAGGACTTCTACCCCTTCCTG
AAGGACAACCGGGAGAAGATCGAGAAGATCCTGACCTTCCGGATCCCCTACTACGT
GGGCCCCCTGGCCCGGGGCAACAGCCGGTTCGCCTGGATGACCCGGAAATCCGAGG
AGACCATCACCCCCTGGAACTTCGAGGAGGTGGTGGACAAGGGCGCCAGCGCCCAG
AGCTTCATCGAGCGGATGACCAACTTCGACAAGAACCTGCCCAACGAGAAGGTGCT
GCCCAAGCACAGCCTGCTGTACGAGTACTTCACCGTGTACAACGAGCTGACCAAGG
TGAAGTACGTGACCGAGGGCATGCGGAAGCCCGCCTTCCTGAGCGGCGAGCAGAAG
AAGGCCATCGTGGACCTGCTGTTCAAGACCAACCGGAAGGTGACCGTGAAGCAGCT
GAAGGAGGACTACTTCAAGAAGATCGAGTGCTTCGACAGCGTGGAGATCAGCGGCG
TGGAGGACCGGTTCAACGCCAGCCTGGGCACCTACCACGACCTGCTGAAGATCATC
AAGGACAAGGACTTCCTGGACAACGAGGAGAACGAGGACATCCTGGAGGACATCG
TGCTGACCCTGACCCTGTTCGAGGACCGGGAGATGATCGAGGAGCGGCTGAAAACC
TACGCCCACCTGTTCGACGACAAGGTGATGAAGCAGCTGAAGCGGCGGCGGTACAC
CGGCTGGGGCCGGCTGAGCCGGAAGCTGATCAACGGCATCCGGGACAAGCAGAGC
GGCAAGACCATCCTGGACTTCCTGAAATCCGACGGCTTCGCCAACCGGAACTTCATG
CAGCTGATCCACGACGACAGCCTGACCTTCAAGGAGGACATCCAGAAGGCCCAGGT
GAGCGGCCAGGGCGACAGCCTGCACGAGCACATCGCCAACCTGGCCGGCAGCCCCG
CCATCAAGAAGGGCATCCTGCAGACCGTGAAGGTGGTGGACGAGCTGGTGAAGGTG
ATGGGCCGGCACAAGCCCGAGAACATCGTGATCGAGATGGCCCGGGAGAACCAGA
CCACCCAGAAGGGCCAGAAGAACAGCCGGGAGCGGATGAAGCGGATCGAGGAGGG
CATCAAGGAGCTGGGCAGCCAGATCCTGAAGGAGCACCCCGTGGAGAACACCCAGC
TGCAGAACGAGAAGCTGTACCTGTACTACCTGCAGAACGGCCGGGACATGTACGTG
GACCAGGAGCTGGACATCAACCGGCTGAGCGACTACGACGTGGCCGCCATCGTGCC
CCAGAGCTTCCTGAAGGACGACAGCATCGACAACAAGGTGCTGACCCGGAGCGACA
AGGCCCGGGGCAAGAGCGACAACGTGCCCAGCGAGGAGGTGGTGAAGAAGATGAA

GAACTACTGGCGGCAGCTGCTGAACGCCAAGCTGATCACCCAGCGGAAGTTCGACA
ACCTGACCAAGGCCGAGCGGGGCGGCCTGAGCGAGCTGGACAAGGCCGGCTTCATC
AAGCGGCAGCTGGTGGAGACCCGGCAGATCACCAAGCACGTGGCCCAGATCCTGGA
CAGCCGGATGAACACCAAGTACGACGAGAACGACAAGCTGATCCGGGAGGTGAAG
GTGATCACCCTGAAATCCAAGCTGGTGAGCGACTTCCGGAAGGACTTCCAGTTCTAC
AAGGTGCGGGAGATCAACAACTACCACCACGCCCACGACGCCTACCTGAACGCCGT
GGTGGGCACCGCCCTGATCAAGAAGTACCCCAAGCTGGAGAGCGAGTTCGTGTACG
GCGACTACAAGGTGTACGACGTGCGGAAGATGATCGCCAAGAGCGAGCAGGAGAT
CGGCAAGGCCACCGCCAAGTACTTCTTCTACAGCAACATCATGAACTTCTTCAAGAC
CGAGATCACCCTGGCCAACGGCGAGATCCGGAAGCGGCCCCTGATCGAGACCAACG
GCGAGACCGGCGAGATCGTGTGGGACAAGGGCCGGGACTTCGCCACCGTGCGGAAG
GTGCTGAGCATGCCCCAGGTGAACATCGTGAAGAAAACCGAGGTGCAGACCGGCGG
CTTCAGCAAGGAGAGCATCCTGCCCAAGCGGAACAGCGACAAGCTGATCGCCCGGA
AGAAGGACTGGGACCCCAAGAAGTACGGCGGCTTCGACAGCCCCACCGTGGCCTAC
AGCGTGCTGGTGGTGGCCAAGGTGGAGAAGGGCAAGAGCAAGAAGCTGAAATCCG
TGAAGGAGCTGCTGGGCATCACCATCATGGAGCGGAGCAGCTTCGAGAAGAACCCC
ATCGACTTCCTGGAGGCCAAGGGCTACAAGGAGGTGAAGAAGGACCTGATCATCAA
GCTGCCCAAGTACAGCCTGTTCGAGCTGGAGAACGGCCGGAAGCGGATGCTGGCCA
GCGCCGGCGAGCTGCAGAAGGGCAACGAGCTGGCCCTGCCCAGCAAGTACGTGAAC
TTCCTGTACCTGGCCAGCCACTACGAGAAGCTGAAGGGCAGCCCCGAGGACAACGA
GCAGAAGCAGCTGTTCGTGGAGCAGCACAAGCACTACCTGGACGAGATCATCGAGC
AGATCAGCGAGTTCAGCAAGCGGGTGATCCTGGCCGACGCCAACCTGGACAAGGTG
CTGAGCGCCTACAACAAGCACCGGGACAAGCCCATCCGGGAGCAGGCCGAGAACAT
CATCCACCTGTTCACCCTGACCAACCTGGGCGCCCCCGCCGCCTTCAAGTACTTCGA
CACCACCATCGACCGGAAGCGGTACACCAGCACCAAGGAGGTGCTGGACGCCACCC
TGATCCACCAGAGCATCACCGGCCTGTACGAGACCCGGATCGACCTGAGCCAGCTG
GGCGGCGACAAGCGGCCCGCCGCCACCAAGAAGGCCGGCCAGGCCAAGAAGAAGA
AGGCCCGGGACAGCAAGGTGGAGAACAAGACCAAGAAGCTGCGGGTGTTCGAGGC
CTTCGCCGGCATCGGCGCCCAGCGGAAGGCCCTGGAGAAGGTGCGGAAGGACGAGT
ACGAGATCGTGGGCCTGGCCGAGTGGTACGTGCCCGCCATCGTGATGTACCAGGCC
ATCCACAACAACTTCCACACCAAGCTGGAGTACAAGAGCGTGAGCCGGGAGGAGAT
GATCGACTACCTGGAGAACAAGACCCTGAGCTGGAACAGCAAGAACCCCGTGAGCA
ACGGCTACTGGAAGCGGAAGAAGGACGACGAGCTGAAGATCATCTACAACGCCATC
AAGCTGAGCGAGAAGGAGGGCAACATCTTCGACATCCGGGACCTGTACAAGCGGAC
CCTGAAGAACATCGACCTGCTGACCTACAGCTTCCCCTGCCAGGACCTGAGCCAGCA
GGGCATCCAGAAGGGCATGAAGCGGGGCAGCGGCACCCGGAGCGGCCTGCTGTGG
GAGATCGAGCGGGCCCTGGACAGCACCGAGAAGAACGACCTGCCCAAGTACCTGCT
GATGGAGAACGTGGGCGCCCTGCTGCACAAGAAGAACGAGGAGGAGCTGAACCAG
TGGAAGCAGAAGCTGGAGAGCCTGGGCTACCAGAACAGCATCGAGGTGCTGAACGC
CGCCGACTTCGGCAGCAGCCAGGCCCGGCGGCGGGTGTTCATGATCAGCACCCTGA

ACGAGTTCGTGGAGCTGCCCAAGGGCGACAAGAAGCCCAAGAGCATCAAGAAGGT
GCTGAACAAGATCGTGAGCGAGAAGGACATCCTGAACAACCTGCTGAAGTACAACC
TGACCGAGTTCAAGAAAACCAAGAGCAACATCAACAAGGCCAGCCTGATCGGCTAC
AGCAAGTTCAACAGCGAGGGCTACGTGTACGACCCCGAGTTCACCGGCCCCACCCT
GACCGCCAGCGGCGCCAACAGCCGGATCAAGATCAAGGACGGCAGCAACATCCGG
AAGATGAACAGCGACGAGACCTTCCTGTACATCGGCTTCGACAGCCAGGACGGCAA
GCGGGTGAACGAGATCGAGTTCCTGACCGAGAACCAGAAGATCTTCGTGTGCGGCA
ACAGCATCAGCGTGGAGGTGCTGGAGGCCATCATCGACAAGATCGGCGGCCCCAGC
AGCGGCGGCAAGCGGCCCGCCGCCACCAAGAAGGCCGGCCAGGCCAAGAAGAAGA
AGGGCAGCTACCCCTACGACGTGCCCGACTACGCCTGAGCGGCCGCTTAATTAAGCT
GCCTTCTGCGGGGCTTGCCTTCTGGCCATGCCCTTCTTCTCTCCCTTGCACCTGTACC
TCTTGGTCTTTGAATAAAGCCTGAGTAGGAAGTCTAGAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
AAAAAAAA (SEQ ID NO: 119)

В некоторых вариантах осуществления репрессор экспрессии содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 35 или 151. В некоторых вариантах осуществления репрессор экспрессии, описанный в данном документе, содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 35, 151 или последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 99 или 100% идентичностью с ней или имеет не более чем 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 положение, отличающееся от нее.

Белковая последовательность dCas9-MQ1:

MAPKKKRKVGIHGVPAADKKYSIGLAIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNT
DRHSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFF
HRLEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLAL
AHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSK
SRRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLDNL
LAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKAL
VRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDL
LRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYPFLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNS
RFAWMTRKSEETITPWNFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYFT
VYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDS
VEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIEERLKT
YAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANRNFMQL
IHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGILQTVKVVDELVKVMGRHK
PENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYY
LQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVAAIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKARGKSDNVPSEE
VVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVA
QILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSKLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNA
VVGTALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMIAKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEIT

LANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVLSMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESIL
PKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIM
ERSSFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLASAGELQKGNELALP
SKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVILADANLDK
VLSAYNKHRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQ
SITGLYETRIDLSQLGGDKRPAATKKAGQAKKKKARDSKVENKTKKLRVFEAFAGIGA
QRKALEKVRKDEYEIVGLAEWYVPAIVMYQAIHNNFHTKLEYKSVSREEMIDYLENKT
LSWNSKNPVSNGYWKRKKDDELKIIYNAIKLSEKEGNIFDIRDLYKRTLKNIDLLTYSFP
CQDLSQQGIQKGMKRGSGTRSGLLWEIERALDSTEKNDLPKYLLMENVGALLHKKNEE
ELNQWKQKLESLGYQNSIEVLNAADFGSSQARRRVFMISTLNEFVELPKGDKKPKSIKK
VLNKIVSEKDILNNLLKYNLTEFKKTKSNINKASLIGYSKFNSEGYVYDPEFTGPTLTASG
ANSRIKIKDGSNIRKMNSDETFLYIGFDSQDGKRVNEIEFLTENQKIFVCGNSISVEVLEAI
IDKIGGPSSGGKRPAATKKAGQAKKKKGSYPYDVPDYA (SEQ ID NO: 35)

MAPKKKRKVGIHGVPAADKKYSIGLAIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNT
DRHSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFF
HRLEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLAL
AHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSK
SRRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLDNL
LAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKAL
VRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDL
LRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYPFLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNS
RFAWMTRKSEETITPWNFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYFT
VYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDS
VEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIEERLKT
YAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANRNFMQL
IHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGILQTVKVVDELVKVMGRHK
PENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYY
LQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVAAIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKARGKSDNVPSEE
VVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVA
QILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSKLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNA
VVGTALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMIAKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEIT
LANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVLSMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESIL
PKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIM
ERSSFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLASAGELQKGNELALP
SKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVILADANLDK
VLSAYNKHRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQ
SITGLYETRIDLSQLGGDKRPAATKKAGQAKKKKARDSKVENKTKKLRVFEAFAGIGA
QRKALEKVRKDEYEIVGLAEWYVPAIVMYQAIHNNFHTKLEYKSVSREEMIDYLENKT
LSWNSKNPVSNGYWKRKKDDELKIIYNAIKLSEKEGNIFDIRDLYKRTLKNIDLLTYSFP
CQDLSQQGIQKGMKRGSGTRSGLLWEIERALDSTEKNDLPKYLLMENVGALLHKKNEE

ELNQWKQKLESLGYQNSIEVLNAADFGSSQARRRVFMISTLNEFVELPKGDKKPKSIKK
VLNKIVSEKDILNNLLKYNLTEFKKTKSNINKASLIGYSKFNSEGYVYDPEFTGPTLTASG
ANSRIKIKDGSNIRKMNSDETFLYIGFDSQDGKRVNEIEFLTENQKIFVCGNSISVEVLEAI
IDKIGGPSSGGKRPAATKKAGQAKKKKGS (SEQ ID NO: 151)

В некоторых вариантах осуществления репрессор экспрессии содержит нацеливающуюся функциональную группу, содержащую dCas9, например dCas9 S. pyogenes, и эффекторную функциональную группу, содержащую KRAB, например домен KRAB. В некоторых вариантах осуществления репрессор экспрессии кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 67 (например, нуклеиновая кислота (например, cDNA), кодирующая репрессор экспрессии). В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота, описанная в данном документе, содержит последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 67 или последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 99 или 100% идентичностью с ней или имеет не более чем 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 положение, отличающееся от нее.

Нуклеотидная последовательность dCas9-KRAB:

AAGGAAATAAGAGAGAAAAGAAGAGTAAGAAGAAATATAAGAGCCACCAT
GGCCCCCAAGAAGAAGCGGAAGGTGGGCATCCACGGCGTGCCCGCCGCCGACAAG
AAGTACAGCATCGGCCTGGCCATCGGCACCAACAGCGTGGGCTGGGCCGTGATCAC
CGACGAGTACAAGGTGCCCAGCAAGAAGTTCAAGGTGCTGGGCAACACCGACCGGC
ACAGCATCAAGAAGAACCTGATCGGCGCCCTGCTGTTCGACAGCGGCGAGACCGCC
GAGGCCACCCGGCTGAAGCGGACCGCCCGGCGGCGGTACACCCGGCGGAAGAACC
GGATCTGCTACCTGCAGGAGATCTTCAGCAACGAGATGGCCAAGGTGGACGACAGC
TTCTTCCACCGGCTGGAGGAGAGCTTCCTGGTGGAGGAGGACAAGAAGCACGAGCG
GCACCCCATCTTCGGCAACATCGTGGACGAGGTGGCCTACCACGAGAAGTACCCCA
CCATCTACCACCTGCGGAAGAAGCTGGTGGACAGCACCGACAAGGCCGACCTGCGG
CTGATCTACCTGGCCCTGGCCCACATGATCAAGTTCCGGGGCCACTTCCTGATCGAG
GGCGACCTGAACCCCGACAACAGCGACGTGGACAAGCTGTTCATCCAGCTGGTGCA
GACCTACAACCAGCTGTTCGAGGAGAACCCCATCAACGCCAGCGGCGTGGACGCCA
AGGCCATCCTGAGCGCCCGGCTGAGCAAGAGCCGGCGGCTGGAGAACCTGATCGCC
CAGCTGCCCGGCGAGAAGAAGAACGGCCTGTTCGGCAACCTGATCGCCCTGAGCCT
GGGCCTGACCCCCAACTTCAAGAGCAACTTCGACCTGGCCGAGGACGCCAAGCTGC
AGCTGAGCAAGGACACCTACGACGACGACCTGGACAACCTGCTGGCCCAGATCGGC
GACCAGTACGCCGACCTGTTCCTGGCCGCCAAGAACCTGAGCGACGCCATCCTGCTG
AGCGACATCCTGCGGGTGAACACCGAGATCACCAAGGCCCCCCTGAGCGCCAGCAT
GATCAAGCGGTACGACGAGCACCACCAGGACCTGACCCTGCTGAAGGCCCTGGTGC
GGCAGCAGCTGCCCGAGAAGTACAAGGAGATCTTCTTCGACCAGAGCAAGAACGGC
TACGCCGGCTACATCGACGGCGGCGCCAGCCAGGAGGAGTTCTACAAGTTCATCAA
GCCCATCCTGGAGAAGATGGACGGCACCGAGGAGCTGCTGGTGAAGCTGAACCGGG
AGGACCTGCTGCGGAAGCAGCGGACCTTCGACAACGGCAGCATCCCCCACCAGATC

CACCTGGGCGAGCTGCACGCCATCCTGCGGCGGCAGGAGGACTTCTACCCCTTCCTG
AAGGACAACCGGGAGAAGATCGAGAAGATCCTGACCTTCCGGATCCCCTACTACGT
GGGCCCCCTGGCCCGGGGCAACAGCCGGTTCGCCTGGATGACCCGGAAATCCGAGG
AGACCATCACCCCCTGGAACTTCGAGGAGGTGGTGGACAAGGGCGCCAGCGCCCAG
AGCTTCATCGAGCGGATGACCAACTTCGACAAGAACCTGCCCAACGAGAAGGTGCT
GCCCAAGCACAGCCTGCTGTACGAGTACTTCACCGTGTACAACGAGCTGACCAAGG
TGAAGTACGTGACCGAGGGCATGCGGAAGCCCGCCTTCCTGAGCGGCGAGCAGAAG
AAGGCCATCGTGGACCTGCTGTTCAAGACCAACCGGAAGGTGACCGTGAAGCAGCT
GAAGGAGGACTACTTCAAGAAGATCGAGTGCTTCGACAGCGTGGAGATCAGCGGCG
TGGAGGACCGGTTCAACGCCAGCCTGGGCACCTACCACGACCTGCTGAAGATCATC
AAGGACAAGGACTTCCTGGACAACGAGGAGAACGAGGACATCCTGGAGGACATCG
TGCTGACCCTGACCCTGTTCGAGGACCGGGAGATGATCGAGGAGCGGCTGAAAACC
TACGCCCACCTGTTCGACGACAAGGTGATGAAGCAGCTGAAGCGGCGGCGGTACAC
CGGCTGGGGCCGGCTGAGCCGGAAGCTGATCAACGGCATCCGGGACAAGCAGAGC
GGCAAGACCATCCTGGACTTCCTGAAATCCGACGGCTTCGCCAACCGGAACTTCATG
CAGCTGATCCACGACGACAGCCTGACCTTCAAGGAGGACATCCAGAAGGCCCAGGT
GAGCGGCCAGGGCGACAGCCTGCACGAGCACATCGCCAACCTGGCCGGCAGCCCCG
CCATCAAGAAGGGCATCCTGCAGACCGTGAAGGTGGTGGACGAGCTGGTGAAGGTG
ATGGGCCGGCACAAGCCCGAGAACATCGTGATCGAGATGGCCCGGGAGAACCAGA
CCACCCAGAAGGGCCAGAAGAACAGCCGGGAGCGGATGAAGCGGATCGAGGAGGG
CATCAAGGAGCTGGGCAGCCAGATCCTGAAGGAGCACCCCGTGGAGAACACCCAGC
TGCAGAACGAGAAGCTGTACCTGTACTACCTGCAGAACGGCCGGGACATGTACGTG
GACCAGGAGCTGGACATCAACCGGCTGAGCGACTACGACGTGGCCGCCATCGTGCC
CCAGAGCTTCCTGAAGGACGACAGCATCGACAACAAGGTGCTGACCCGGAGCGACA
AGGCCCGGGGCAAGAGCGACAACGTGCCCAGCGAGGAGGTGGTGAAGAAGATGAA
GAACTACTGGCGGCAGCTGCTGAACGCCAAGCTGATCACCCAGCGGAAGTTCGACA
ACCTGACCAAGGCCGAGCGGGGCGGCCTGAGCGAGCTGGACAAGGCCGGCTTCATC
AAGCGGCAGCTGGTGGAGACCCGGCAGATCACCAAGCACGTGGCCCAGATCCTGGA
CAGCCGGATGAACACCAAGTACGACGAGAACGACAAGCTGATCCGGGAGGTGAAG
GTGATCACCCTGAAATCCAAGCTGGTGAGCGACTTCCGGAAGGACTTCCAGTTCTAC
AAGGTGCGGGAGATCAACAACTACCACCACGCCCACGACGCCTACCTGAACGCCGT
GGTGGGCACCGCCCTGATCAAGAAGTACCCCAAGCTGGAGAGCGAGTTCGTGTACG
GCGACTACAAGGTGTACGACGTGCGGAAGATGATCGCCAAGAGCGAGCAGGAGAT
CGGCAAGGCCACCGCCAAGTACTTCTTCTACAGCAACATCATGAACTTCTTCAAGAC
CGAGATCACCCTGGCCAACGGCGAGATCCGGAAGCGGCCCCTGATCGAGACCAACG
GCGAGACCGGCGAGATCGTGTGGGACAAGGGCCGGGACTTCGCCACCGTGCGGAAG
GTGCTGAGCATGCCCCAGGTGAACATCGTGAAGAAAACCGAGGTGCAGACCGGCGG
CTTCAGCAAGGAGAGCATCCTGCCCAAGCGGAACAGCGACAAGCTGATCGCCCGGA
AGAAGGACTGGGACCCCAAGAAGTACGGCGGCTTCGACAGCCCCACCGTGGCCTAC
AGCGTGCTGGTGGTGGCCAAGGTGGAGAAGGGCAAGAGCAAGAAGCTGAAATCCG

TGAAGGAGCTGCTGGGCATCACCATCATGGAGCGGAGCAGCTTCGAGAAGAACCCC
ATCGACTTCCTGGAGGCCAAGGGCTACAAGGAGGTGAAGAAGGACCTGATCATCAA
GCTGCCCAAGTACAGCCTGTTCGAGCTGGAGAACGGCCGGAAGCGGATGCTGGCCA
GCGCCGGCGAGCTGCAGAAGGGCAACGAGCTGGCCCTGCCCAGCAAGTACGTGAAC
TTCCTGTACCTGGCCAGCCACTACGAGAAGCTGAAGGGCAGCCCCGAGGACAACGA
GCAGAAGCAGCTGTTCGTGGAGCAGCACAAGCACTACCTGGACGAGATCATCGAGC
AGATCAGCGAGTTCAGCAAGCGGGTGATCCTGGCCGACGCCAACCTGGACAAGGTG
CTGAGCGCCTACAACAAGCACCGGGACAAGCCCATCCGGGAGCAGGCCGAGAACAT
CATCCACCTGTTCACCCTGACCAACCTGGGCGCCCCCGCCGCCTTCAAGTACTTCGA
CACCACCATCGACCGGAAGCGGTACACCAGCACCAAGGAGGTGCTGGACGCCACCC
TGATCCACCAGAGCATCACCGGCCTGTACGAGACCCGGATCGACCTGAGCCAGCTG
GGCGGCGACAAGCGGCCCGCCGCCACCAAGAAGGCCGGCCAGGCCAAGAAGAAGA
AGGCCAGCGACGCCAAGAGCCTGACCGCCTGGAGCCGGACCCTGGTGACCTTCAAG
GACGTGTTCGTGGACTTCACCCGGGAGGAGTGGAAGCTGCTGGACACCGCCCAGCA
GATCCTGTACCGGAACGTGATGCTGGAGAACTACAAGAACCTGGTGAGCCTGGGCT
ACCAGCTGACCAAGCCCGACGTGATCCTGCGGCTGGAGAAGGGCGAGGAGCCCTGG
CTGGTGGAGCGGGAGATCCACCAGGAGACCCACCCCGACAGCGAGACCGCCTTCGA
GATCAAGAGCAGCGTGAGCGGCGGCAAGCGGCCCGCCGCCACCAAGAAGGCCGGC
CAGGCCAAGAAGAAGAAGGGCAGCTACCCCTACGACGTGCCCGACTACGCCTGAGC
GGCCGCTTAATTAAGCTGCCTTCTGCGGGGCTTGCCTTCTGGCCATGCCCTTCTTCTC
TCCCTTGCACCTGTACCTCTTGGTCTTTGAATAAAGCCTGAGTAGGAAGTCTAGAAA
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA (SEQ ID NO: 67)

В некоторых вариантах осуществления репрессор экспрессии содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 34 или 150. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота, описанная в данном документе, содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 34, 150 или последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 99 или 100% идентичностью с ней или имеет не более чем 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 положение, отличающееся от нее.

Белковая последовательность dCas9-KRAB:

MAPKKKRKVGIHGVPAADKKYSIGLAIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNT
DRHSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFF
HRLEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLAL
AHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSK
SRRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLDNL
LAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKAL
VRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDL
LRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYPFLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNS
RFAWMTRKSEETITPWNFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYFT

VYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDS
VEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIEERLKT
YAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANRNFMQL
IHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGILQTVKVVDELVKVMGRHK
PENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYY
LQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVAAIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKARGKSDNVPSEE
VVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVA
QILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSKLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNA
VVGTALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMIAKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEIT
LANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVLSMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESIL
PKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIM
ERSSFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLASAGELQKGNELALP
SKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVILADANLDK
VLSAYNKHRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQ
SITGLYETRIDLSQLGGDKRPAATKKAGQAKKKKASDAKSLTAWSRTLVTFKDVFVDFT
REEWKLLDTAQQILYRNVMLENYKNLVSLGYQLTKPDVILRLEKGEEPWLVEREIHQET
HPDSETAFEIKSSVSGGKRPAATKKAGQAKKKKGSYPYDVPDYA (SEQ ID NO: 34)

MAPKKKRKVGIHGVPAADKKYSIGLAIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNT
DRHSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFF
HRLEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLAL
AHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSK
SRRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLDNL
LAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKAL
VRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDL
LRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYPFLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNS
RFAWMTRKSEETITPWNFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYFT
VYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDS
VEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIEERLKT
YAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANRNFMQL
IHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGILQTVKVVDELVKVMGRHK
PENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYY
LQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVAAIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKARGKSDNVPSEE
VVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVA
QILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSKLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNA
VVGTALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMIAKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEIT
LANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVLSMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESIL
PKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIM
ERSSFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLASAGELQKGNELALP
SKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVILADANLDK
VLSAYNKHRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQ

SITGLYETRIDLSQLGGDKRPAATKKAGQAKKKKASDAKSLTAWSRTLVTFKDVFVDFT
REEWKLLDTAQQILYRNVMLENYKNLVSLGYQLTKPDVILRLEKGEEPWLVEREIHQET
HPDSETAFEIKSSVSGGKRPAATKKAGQAKKKKGS (SEQ ID NO: 150)

В некоторых вариантах осуществления репрессор экспрессии содержит нацеливающуюся на ДНК функциональную группу, содержащую dCas9, например dCas9 S. aureus, и эффекторную функциональную группу, содержащую DNMT1, например DNMT1 человека. В некоторых вариантах осуществления репрессор экспрессии кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 69 (например, нуклеиновая кислота (например, cDNA), кодирующая репрессор экспрессии). В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота, описанная в данном документе, содержит последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 69 или последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 99 или 100% идентичностью с ней или имеет не более чем 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 положение, отличающееся от нее.

Нуклеотидная последовательность dCas9-DNMT1

AGGAAATAAGAGAGAAAAGAAGAGTAAGAAGAAATATAAGAGCCACCATG
GCCCCCAAGAAGAAGCGGAAGGTGGGCATCCACGGCGTGCCCGCCGCCGACAAGA
AGTACAGCATCGGCCTGGCCATCGGCACCAACAGCGTGGGCTGGGCCGTGATCACC
GACGAGTACAAGGTGCCCAGCAAGAAGTTCAAGGTGCTGGGCAACACCGACCGGCA
CAGCATCAAGAAGAACCTGATCGGCGCCCTGCTGTTCGACAGCGGCGAGACCGCCG
AGGCCACCCGGCTGAAGCGGACCGCCCGGCGGCGGTACACCCGGCGGAAGAACCG
GATCTGCTACCTGCAGGAGATCTTCAGCAACGAGATGGCCAAGGTGGACGACAGCT
TCTTCCACCGGCTGGAGGAGAGCTTCCTGGTGGAGGAGGACAAGAAGCACGAGCGG
CACCCCATCTTCGGCAACATCGTGGACGAGGTGGCCTACCACGAGAAGTACCCCAC
CATCTACCACCTGCGGAAGAAGCTGGTGGACAGCACCGACAAGGCCGACCTGCGGC
TGATCTACCTGGCCCTGGCCCACATGATCAAGTTCCGGGGCCACTTCCTGATCGAGG
GCGACCTGAACCCCGACAACAGCGACGTGGACAAGCTGTTCATCCAGCTGGTGCAG
ACCTACAACCAGCTGTTCGAGGAGAACCCCATCAACGCCAGCGGCGTGGACGCCAA
GGCCATCCTGAGCGCCCGGCTGAGCAAGAGCCGGCGGCTGGAGAACCTGATCGCCC
AGCTGCCCGGCGAGAAGAAGAACGGCCTGTTCGGCAACCTGATCGCCCTGAGCCTG
GGCCTGACCCCCAACTTCAAGAGCAACTTCGACCTGGCCGAGGACGCCAAGCTGCA
GCTGAGCAAGGACACCTACGACGACGACCTGGACAACCTGCTGGCCCAGATCGGCG
ACCAGTACGCCGACCTGTTCCTGGCCGCCAAGAACCTGAGCGACGCCATCCTGCTGA
GCGACATCCTGCGGGTGAACACCGAGATCACCAAGGCCCCCCTGAGCGCCAGCATG
ATCAAGCGGTACGACGAGCACCACCAGGACCTGACCCTGCTGAAGGCCCTGGTGCG
GCAGCAGCTGCCCGAGAAGTACAAGGAGATCTTCTTCGACCAGAGCAAGAACGGCT
ACGCCGGCTACATCGACGGCGGCGCCAGCCAGGAGGAGTTCTACAAGTTCATCAAG
CCCATCCTGGAGAAGATGGACGGCACCGAGGAGCTGCTGGTGAAGCTGAACCGGGA
GGACCTGCTGCGGAAGCAGCGGACCTTCGACAACGGCAGCATCCCCCACCAGATCC
ACCTGGGCGAGCTGCACGCCATCCTGCGGCGGCAGGAGGACTTCTACCCCTTCCTGA

AGGACAACCGGGAGAAGATCGAGAAGATCCTGACCTTCCGGATCCCCTACTACGTG
GGCCCCCTGGCCCGGGGCAACAGCCGGTTCGCCTGGATGACCCGGAAATCCGAGGA
GACCATCACCCCCTGGAACTTCGAGGAGGTGGTGGACAAGGGCGCCAGCGCCCAGA
GCTTCATCGAGCGGATGACCAACTTCGACAAGAACCTGCCCAACGAGAAGGTGCTG
CCCAAGCACAGCCTGCTGTACGAGTACTTCACCGTGTACAACGAGCTGACCAAGGT
GAAGTACGTGACCGAGGGCATGCGGAAGCCCGCCTTCCTGAGCGGCGAGCAGAAGA
AGGCCATCGTGGACCTGCTGTTCAAGACCAACCGGAAGGTGACCGTGAAGCAGCTG
AAGGAGGACTACTTCAAGAAGATCGAGTGCTTCGACAGCGTGGAGATCAGCGGCGT
GGAGGACCGGTTCAACGCCAGCCTGGGCACCTACCACGACCTGCTGAAGATCATCA
AGGACAAGGACTTCCTGGACAACGAGGAGAACGAGGACATCCTGGAGGACATCGT
GCTGACCCTGACCCTGTTCGAGGACCGGGAGATGATCGAGGAGCGGCTGAAAACCT
ACGCCCACCTGTTCGACGACAAGGTGATGAAGCAGCTGAAGCGGCGGCGGTACACC
GGCTGGGGCCGGCTGAGCCGGAAGCTGATCAACGGCATCCGGGACAAGCAGAGCG
GCAAGACCATCCTGGACTTCCTGAAATCCGACGGCTTCGCCAACCGGAACTTCATGC
AGCTGATCCACGACGACAGCCTGACCTTCAAGGAGGACATCCAGAAGGCCCAGGTG
AGCGGCCAGGGCGACAGCCTGCACGAGCACATCGCCAACCTGGCCGGCAGCCCCGC
CATCAAGAAGGGCATCCTGCAGACCGTGAAGGTGGTGGACGAGCTGGTGAAGGTGA
TGGGCCGGCACAAGCCCGAGAACATCGTGATCGAGATGGCCCGGGAGAACCAGACC
ACCCAGAAGGGCCAGAAGAACAGCCGGGAGCGGATGAAGCGGATCGAGGAGGGCA
TCAAGGAGCTGGGCAGCCAGATCCTGAAGGAGCACCCCGTGGAGAACACCCAGCTG
CAGAACGAGAAGCTGTACCTGTACTACCTGCAGAACGGCCGGGACATGTACGTGGA
CCAGGAGCTGGACATCAACCGGCTGAGCGACTACGACGTGGCCGCCATCGTGCCCC
AGAGCTTCCTGAAGGACGACAGCATCGACAACAAGGTGCTGACCCGGAGCGACAAG
GCCCGGGGCAAGAGCGACAACGTGCCCAGCGAGGAGGTGGTGAAGAAGATGAAGA
ACTACTGGCGGCAGCTGCTGAACGCCAAGCTGATCACCCAGCGGAAGTTCGACAAC
CTGACCAAGGCCGAGCGGGGCGGCCTGAGCGAGCTGGACAAGGCCGGCTTCATCAA
GCGGCAGCTGGTGGAGACCCGGCAGATCACCAAGCACGTGGCCCAGATCCTGGACA
GCCGGATGAACACCAAGTACGACGAGAACGACAAGCTGATCCGGGAGGTGAAGGT
GATCACCCTGAAATCCAAGCTGGTGAGCGACTTCCGGAAGGACTTCCAGTTCTACAA
GGTGCGGGAGATCAACAACTACCACCACGCCCACGACGCCTACCTGAACGCCGTGG
TGGGCACCGCCCTGATCAAGAAGTACCCCAAGCTGGAGAGCGAGTTCGTGTACGGC
GACTACAAGGTGTACGACGTGCGGAAGATGATCGCCAAGAGCGAGCAGGAGATCG
GCAAGGCCACCGCCAAGTACTTCTTCTACAGCAACATCATGAACTTCTTCAAGACCG
AGATCACCCTGGCCAACGGCGAGATCCGGAAGCGGCCCCTGATCGAGACCAACGGC
GAGACCGGCGAGATCGTGTGGGACAAGGGCCGGGACTTCGCCACCGTGCGGAAGGT
GCTGAGCATGCCCCAGGTGAACATCGTGAAGAAAACCGAGGTGCAGACCGGCGGCT
TCAGCAAGGAGAGCATCCTGCCCAAGCGGAACAGCGACAAGCTGATCGCCCGGAAG
AAGGACTGGGACCCCAAGAAGTACGGCGGCTTCGACAGCCCCACCGTGGCCTACAG
CGTGCTGGTGGTGGCCAAGGTGGAGAAGGGCAAGAGCAAGAAGCTGAAATCCGTG
AAGGAGCTGCTGGGCATCACCATCATGGAGCGGAGCAGCTTCGAGAAGAACCCCAT

CGACTTCCTGGAGGCCAAGGGCTACAAGGAGGTGAAGAAGGACCTGATCATCAAGC
TGCCCAAGTACAGCCTGTTCGAGCTGGAGAACGGCCGGAAGCGGATGCTGGCCAGC
GCCGGCGAGCTGCAGAAGGGCAACGAGCTGGCCCTGCCCAGCAAGTACGTGAACTT
CCTGTACCTGGCCAGCCACTACGAGAAGCTGAAGGGCAGCCCCGAGGACAACGAGC
AGAAGCAGCTGTTCGTGGAGCAGCACAAGCACTACCTGGACGAGATCATCGAGCAG
ATCAGCGAGTTCAGCAAGCGGGTGATCCTGGCCGACGCCAACCTGGACAAGGTGCT
GAGCGCCTACAACAAGCACCGGGACAAGCCCATCCGGGAGCAGGCCGAGAACATC
ATCCACCTGTTCACCCTGACCAACCTGGGCGCCCCCGCCGCCTTCAAGTACTTCGAC
ACCACCATCGACCGGAAGCGGTACACCAGCACCAAGGAGGTGCTGGACGCCACCCT
GATCCACCAGAGCATCACCGGCCTGTACGAGACCCGGATCGACCTGAGCCAGCTGG
GCGGCGACAGCGGCGGCAAGCGGCCCGCCGCCACCAAGAAGGCCGGCCAGGCCAA
GAAGAAGAAGTCGGGCGGGGGTGGCTCAGTGGATCTGAGGACACTCGACGTGTTTA
GCGGATGCGGCGGACTCTCCGAAGGCTTCCACCAAGCCGGAATTTCCGACACACTCT
GGGCCATTGAGATGTGGGACCCCGCCGCTCAAGCCTTCAGACTGAATAATCCCGGCT
CCACCGTGTTCACCGAGGACTGCAACATTCTGCTGAAGCTGGTGATGGCTGGCGAA
ACCACCAACTCTAGAGGCCAGAGGCTGCCCCAGAAGGGAGATGTGGAAATGCTCTG
TGGAGGCCCTCCTTGCCAAGGCTTCTCCGGCATGAACAGGTTCAACTCTAGAACATA
CAGCAAGTTCAAGAACTCTCTGGTCGTGAGCTTTCTGAGCTACTGCGACTACTATAG
ACCTAGGTTCTTTCTGCTGGAGAACGTGAGAAATTTCGTGTCCTTCAAGAGGAGCAT
GGTGCTGAAGCTGACACTGAGGTGTCTGGTGAGGATGGGCTACCAGTGCACATTCG
GAGTGCTGCAAGCTGGCCAGTACGGCGTGGCCCAGACCAGAAGGAGGGCCATCATT
CTGGCTGCTGCCCCCGGCGAGAAACTCCCTCTGTTCCCCGAGCCCCTCCACGTGTTC
GCCCCTAGAGCTTGCCAGCTGAGCGTGGTGGTCGACGATAAGAAGTTCGTGAGCAA
CATCACAAGGCTGTCCAGCGGACCCTTCAGAACCATTACCGTGAGGGATACCATGTC
CGACCTCCCCGAGGTGAGGAATGGCGCCAGCGCTCTGGAGATTTCCTACAACGGCG
AACCTCAGAGCTGGTTCCAAAGGCAGCTGAGAGGCGCTCAGTATCAGCCCATTCTG
AGGGACCACATCTGCAAAGATATGAGCGCTCTGGTGGCCGCTAGAATGAGACATAT
TCCTCTGGCCCCCGGCAGCGACTGGAGAGATCTGCCCAATATTGAGGTGAGACTCA
GCGACGGAACAATGGCTAGAAAACTGAGGTACACCCATCATGATAGAAAGAACGG
AAGGAGCAGCAGCGGCGCTCTGAGAGGAGTGTGTAGCTGCGTGGAAGCTGGCAAG
GCTTGCGATCCCGCCGCTAGGCAGTTCAATACCCTCATCCCTTGGTGTCTGCCTCAC
ACCGGCAACAGACACAATCATTGGGCTGGACTGTATGGAAGGCTCGAATGGGACGG
CTTTTTCAGCACCACCGTGACCAATCCCGAACCTATGGGCAAGCAAGGAAGGGTGC
TCCACCCCGAGCAGCATAGAGTCGTGTCCGTGAGAGAATGCGCTAGAAGCCAAGGC
TTCCCCGACACCTATAGACTGTTCGGCAACATTCTGGATAAGCACAGACAAGTGGG
AAATGCTGTCCCTCCTCCTCTGGCCAAGGCTATCGGACTGGAGATCAAGCTGTGTAT
GCTCGCCAAAGCTAGGGAGAGCGCTTCCGCCAAGATTAAGGAGGAGGAGGCCGCCA
AGGACGGAGGTGGCGGATCGGGAAAGCGGCCCGCCGCCACCAAGAAGGCCGGTCA
GGCCAAGAAGAAGAAGGGCAGCTACCCCTACGACGTGCCCGACTACGCCTGAGCGG
CCGCTTAATTAAGCTGCCTTCTGCGGGGCTTGCCTTCTGGCCATGCCCTTCTTCTCTC

CCTTGCACCTGTACCTCTTGGTCTTTGAATAAAGCCTGAGTAGGAAGTCTAGAAAAA
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA (SEQ ID NO: 69)

В некоторых вариантах осуществления репрессор экспрессии содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 36 или 152. В некоторых вариантах осуществления репрессор экспрессии, описанный в данном документе, содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 36, 152 или последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 99 или 100% идентичностью с ней или имеет не более чем 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 положение, отличающееся от нее.

Белковая последовательность dCas9-DNMT1:

MAPKKKRKVGIHGVPAADKKYSIGLAIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNT
DRHSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFF
HRLEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLAL
AHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSK
SRRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLDNL
LAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKAL
VRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDL
LRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYPFLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNS
RFAWMTRKSEETITPWNFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYFT
VYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDS
VEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIEERLKT
YAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANRNFMQL
IHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGILQTVKVVDELVKVMGRHK
PENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYY
LQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVAAIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKARGKSDNVPSEE
VVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVA
QILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSKLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNA
VVGTALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMIAKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEIT
LANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVLSMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESIL
PKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIM
ERSSFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLASAGELQKGNELALP
SKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVILADANLDK
VLSAYNKHRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQ
SITGLYETRIDLSQLGGDSGGKRPAATKKAGQAKKKKSGGGGSVDLRTLDVFSGCGGLS
EGFHQAGISDTLWAIEMWDPAAQAFRLNNPGSTVFTEDCNILLKLVMAGETTNSRGQR
LPQKGDVEMLCGGPPCQGFSGMNRFNSRTYSKFKNSLVVSFLSYCDYYRPRFFLLENVR
NFVSFKRSMVLKLTLRCLVRMGYQCTFGVLQAGQYGVAQTRRRAIILAAAPGEKLPLFP
EPLHVFAPRACQLSVVVDDKKFVSNITRLSSGPFRTITVRDTMSDLPEVRNGASALEISY
NGEPQSWFQRQLRGAQYQPILRDHICKDMSALVAARMRHIPLAPGSDWRDLPNIEVRLS

DGTMARKLRYTHHDRKNGRSSSGALRGVCSCVEAGKACDPAARQFNTLIPWCLPHTG
NRHNHWAGLYGRLEWDGFFSTTVTNPEPMGKQGRVLHPEQHRVVSVRECARSQGFPD
TYRLFGNILDKHRQVGNAVPPPLAKAIGLEIKLCMLAKARESASAKIKEEEAAKDGGGG
SGKRPAATKKAGQAKKKKGSYPYDVPDYA (SEQ ID NO: 36)

MAPKKKRKVGIHGVPAADKKYSIGLAIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNT
DRHSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFF
HRLEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLAL
AHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSK
SRRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLDNL
LAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKAL
VRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDL
LRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYPFLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNS
RFAWMTRKSEETITPWNFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYFT
VYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDS
VEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIEERLKT
YAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANRNFMQL
IHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGILQTVKVVDELVKVMGRHK
PENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYY
LQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVAAIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKARGKSDNVPSEE
VVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVA
QILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSKLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNA
VVGTALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMIAKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEIT
LANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVLSMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESIL
PKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIM
ERSSFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLASAGELQKGNELALP
SKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVILADANLDK
VLSAYNKHRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQ
SITGLYETRIDLSQLGGDSGGKRPAATKKAGQAKKKKSGGGGSVDLRTLDVFSGCGGLS
EGFHQAGISDTLWAIEMWDPAAQAFRLNNPGSTVFTEDCNILLKLVMAGETTNSRGQR
LPQKGDVEMLCGGPPCQGFSGMNRFNSRTYSKFKNSLVVSFLSYCDYYRPRFFLLENVR
NFVSFKRSMVLKLTLRCLVRMGYQCTFGVLQAGQYGVAQTRRRAIILAAAPGEKLPLFP
EPLHVFAPRACQLSVVVDDKKFVSNITRLSSGPFRTITVRDTMSDLPEVRNGASALEISY
NGEPQSWFQRQLRGAQYQPILRDHICKDMSALVAARMRHIPLAPGSDWRDLPNIEVRLS
DGTMARKLRYTHHDRKNGRSSSGALRGVCSCVEAGKACDPAARQFNTLIPWCLPHTG
NRHNHWAGLYGRLEWDGFFSTTVTNPEPMGKQGRVLHPEQHRVVSVRECARSQGFPD
TYRLFGNILDKHRQVGNAVPPPLAKAIGLEIKLCMLAKARESASAKIKEEEAAKDGGGG
SGKRPAATKKAGQAKKKKGS (SEQ ID NO: 152)

В некоторых вариантах осуществления репрессор экспрессии содержит нацеливающуюся на ДНК функциональную группу, содержащую dCas9, например dCas9 S. aureus, и эффекторную функциональную группу, содержащую DNMT13a/3L. В

некоторых вариантах осуществления репрессор экспрессии кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 70 (например, нуклеиновая кислота (например, cDNA), кодирующая репрессор экспрессии). В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота, описанная в данном документе, содержит последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 70 или последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 99 или 100% идентичностью с ней или имеет не более чем 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 положение, отличающееся от нее.

Нуклеотидная последовательность dCas9-DNMT3a/3L

AGGAAATAAGAGAGAAAAGAAGAGTAAGAAGAAATATAAGAGCCACCATG
GCCCCCAAGAAGAAGCGGAAGGTGGGCATCCACGGCGTGCCCGCCGCCGACAAGA
AGTACAGCATCGGCCTGGCCATCGGCACCAACAGCGTGGGCTGGGCCGTGATCACC
GACGAGTACAAGGTGCCCAGCAAGAAGTTCAAGGTGCTGGGCAACACCGACCGGCA
CAGCATCAAGAAGAACCTGATCGGCGCCCTGCTGTTCGACAGCGGCGAGACCGCCG
AGGCCACCCGGCTGAAGCGGACCGCCCGGCGGCGGTACACCCGGCGGAAGAACCG
GATCTGCTACCTGCAGGAGATCTTCAGCAACGAGATGGCCAAGGTGGACGACAGCT
TCTTCCACCGGCTGGAGGAGAGCTTCCTGGTGGAGGAGGACAAGAAGCACGAGCGG
CACCCCATCTTCGGCAACATCGTGGACGAGGTGGCCTACCACGAGAAGTACCCCAC
CATCTACCACCTGCGGAAGAAGCTGGTGGACAGCACCGACAAGGCCGACCTGCGGC
TGATCTACCTGGCCCTGGCCCACATGATCAAGTTCCGGGGCCACTTCCTGATCGAGG
GCGACCTGAACCCCGACAACAGCGACGTGGACAAGCTGTTCATCCAGCTGGTGCAG
ACCTACAACCAGCTGTTCGAGGAGAACCCCATCAACGCCAGCGGCGTGGACGCCAA
GGCCATCCTGAGCGCCCGGCTGAGCAAGAGCCGGCGGCTGGAGAACCTGATCGCCC
AGCTGCCCGGCGAGAAGAAGAACGGCCTGTTCGGCAACCTGATCGCCCTGAGCCTG
GGCCTGACCCCCAACTTCAAGAGCAACTTCGACCTGGCCGAGGACGCCAAGCTGCA
GCTGAGCAAGGACACCTACGACGACGACCTGGACAACCTGCTGGCCCAGATCGGCG
ACCAGTACGCCGACCTGTTCCTGGCCGCCAAGAACCTGAGCGACGCCATCCTGCTGA
GCGACATCCTGCGGGTGAACACCGAGATCACCAAGGCCCCCCTGAGCGCCAGCATG
ATCAAGCGGTACGACGAGCACCACCAGGACCTGACCCTGCTGAAGGCCCTGGTGCG
GCAGCAGCTGCCCGAGAAGTACAAGGAGATCTTCTTCGACCAGAGCAAGAACGGCT
ACGCCGGCTACATCGACGGCGGCGCCAGCCAGGAGGAGTTCTACAAGTTCATCAAG
CCCATCCTGGAGAAGATGGACGGCACCGAGGAGCTGCTGGTGAAGCTGAACCGGGA
GGACCTGCTGCGGAAGCAGCGGACCTTCGACAACGGCAGCATCCCCCACCAGATCC
ACCTGGGCGAGCTGCACGCCATCCTGCGGCGGCAGGAGGACTTCTACCCCTTCCTGA
AGGACAACCGGGAGAAGATCGAGAAGATCCTGACCTTCCGGATCCCCTACTACGTG
GGCCCCCTGGCCCGGGGCAACAGCCGGTTCGCCTGGATGACCCGGAAATCCGAGGA
GACCATCACCCCCTGGAACTTCGAGGAGGTGGTGGACAAGGGCGCCAGCGCCCAGA
GCTTCATCGAGCGGATGACCAACTTCGACAAGAACCTGCCCAACGAGAAGGTGCTG
CCCAAGCACAGCCTGCTGTACGAGTACTTCACCGTGTACAACGAGCTGACCAAGGT
GAAGTACGTGACCGAGGGCATGCGGAAGCCCGCCTTCCTGAGCGGCGAGCAGAAGA

AGGCCATCGTGGACCTGCTGTTCAAGACCAACCGGAAGGTGACCGTGAAGCAGCTG
AAGGAGGACTACTTCAAGAAGATCGAGTGCTTCGACAGCGTGGAGATCAGCGGCGT
GGAGGACCGGTTCAACGCCAGCCTGGGCACCTACCACGACCTGCTGAAGATCATCA
AGGACAAGGACTTCCTGGACAACGAGGAGAACGAGGACATCCTGGAGGACATCGT
GCTGACCCTGACCCTGTTCGAGGACCGGGAGATGATCGAGGAGCGGCTGAAAACCT
ACGCCCACCTGTTCGACGACAAGGTGATGAAGCAGCTGAAGCGGCGGCGGTACACC
GGCTGGGGCCGGCTGAGCCGGAAGCTGATCAACGGCATCCGGGACAAGCAGAGCG
GCAAGACCATCCTGGACTTCCTGAAATCCGACGGCTTCGCCAACCGGAACTTCATGC
AGCTGATCCACGACGACAGCCTGACCTTCAAGGAGGACATCCAGAAGGCCCAGGTG
AGCGGCCAGGGCGACAGCCTGCACGAGCACATCGCCAACCTGGCCGGCAGCCCCGC
CATCAAGAAGGGCATCCTGCAGACCGTGAAGGTGGTGGACGAGCTGGTGAAGGTGA
TGGGCCGGCACAAGCCCGAGAACATCGTGATCGAGATGGCCCGGGAGAACCAGACC
ACCCAGAAGGGCCAGAAGAACAGCCGGGAGCGGATGAAGCGGATCGAGGAGGGCA
TCAAGGAGCTGGGCAGCCAGATCCTGAAGGAGCACCCCGTGGAGAACACCCAGCTG
CAGAACGAGAAGCTGTACCTGTACTACCTGCAGAACGGCCGGGACATGTACGTGGA
CCAGGAGCTGGACATCAACCGGCTGAGCGACTACGACGTGGCCGCCATCGTGCCCC
AGAGCTTCCTGAAGGACGACAGCATCGACAACAAGGTGCTGACCCGGAGCGACAAG
GCCCGGGGCAAGAGCGACAACGTGCCCAGCGAGGAGGTGGTGAAGAAGATGAAGA
ACTACTGGCGGCAGCTGCTGAACGCCAAGCTGATCACCCAGCGGAAGTTCGACAAC
CTGACCAAGGCCGAGCGGGGCGGCCTGAGCGAGCTGGACAAGGCCGGCTTCATCAA
GCGGCAGCTGGTGGAGACCCGGCAGATCACCAAGCACGTGGCCCAGATCCTGGACA
GCCGGATGAACACCAAGTACGACGAGAACGACAAGCTGATCCGGGAGGTGAAGGT
GATCACCCTGAAATCCAAGCTGGTGAGCGACTTCCGGAAGGACTTCCAGTTCTACAA
GGTGCGGGAGATCAACAACTACCACCACGCCCACGACGCCTACCTGAACGCCGTGG
TGGGCACCGCCCTGATCAAGAAGTACCCCAAGCTGGAGAGCGAGTTCGTGTACGGC
GACTACAAGGTGTACGACGTGCGGAAGATGATCGCCAAGAGCGAGCAGGAGATCG
GCAAGGCCACCGCCAAGTACTTCTTCTACAGCAACATCATGAACTTCTTCAAGACCG
AGATCACCCTGGCCAACGGCGAGATCCGGAAGCGGCCCCTGATCGAGACCAACGGC
GAGACCGGCGAGATCGTGTGGGACAAGGGCCGGGACTTCGCCACCGTGCGGAAGGT
GCTGAGCATGCCCCAGGTGAACATCGTGAAGAAAACCGAGGTGCAGACCGGCGGCT
TCAGCAAGGAGAGCATCCTGCCCAAGCGGAACAGCGACAAGCTGATCGCCCGGAAG
AAGGACTGGGACCCCAAGAAGTACGGCGGCTTCGACAGCCCCACCGTGGCCTACAG
CGTGCTGGTGGTGGCCAAGGTGGAGAAGGGCAAGAGCAAGAAGCTGAAATCCGTG
AAGGAGCTGCTGGGCATCACCATCATGGAGCGGAGCAGCTTCGAGAAGAACCCCAT
CGACTTCCTGGAGGCCAAGGGCTACAAGGAGGTGAAGAAGGACCTGATCATCAAGC
TGCCCAAGTACAGCCTGTTCGAGCTGGAGAACGGCCGGAAGCGGATGCTGGCCAGC
GCCGGCGAGCTGCAGAAGGGCAACGAGCTGGCCCTGCCCAGCAAGTACGTGAACTT
CCTGTACCTGGCCAGCCACTACGAGAAGCTGAAGGGCAGCCCCGAGGACAACGAGC
AGAAGCAGCTGTTCGTGGAGCAGCACAAGCACTACCTGGACGAGATCATCGAGCAG
ATCAGCGAGTTCAGCAAGCGGGTGATCCTGGCCGACGCCAACCTGGACAAGGTGCT

GAGCGCCTACAACAAGCACCGGGACAAGCCCATCCGGGAGCAGGCCGAGAACATC
ATCCACCTGTTCACCCTGACCAACCTGGGCGCCCCCGCCGCCTTCAAGTACTTCGAC
ACCACCATCGACCGGAAGCGGTACACCAGCACCAAGGAGGTGCTGGACGCCACCCT
GATCCACCAGAGCATCACCGGCCTGTACGAGACCCGGATCGACCTGAGCCAGCTGG
GCGGCGACAGCGCCGGCGGCGGCGGCAGCGGCGGCGGCGGCAGCGGCGGCGGCGG
CAGCGGCCCCAAGAAGAAGCGGAAGGTGGCCGCCGCCGGCAGCAACCACGACCAG
GAGTTCGACCCCCCCAAGGTGTACCCCCCCGTGCCCGCCGAGAAGCGGAAGCCCAT
CCGGGTGCTGAGCCTGTTCGACGGCATCGCCACCGGCCTGCTGGTGCTGAAGGACCT
GGGCATCCAGGTGGACCGGTACATCGCCAGCGAGGTGTGCGAGGACAGCATCACCG
TGGGCATGGTGCGGCACCAGGGCAAGATCATGTACGTGGGCGACGTGCGGAGCGTG
ACCCAGAAGCACATCCAGGAGTGGGGCCCCTTCGACCTGGTGATCGGCGGCAGCCC
CTGCAACGACCTGAGCATCGTGAACCCCGCCCGGAAGGGCCTGTACGAGGGCACCG
GCCGGCTGTTCTTCGAGTTCTACCGGCTGCTGCACGACGCCCGGCCCAAGGAGGGCG
ACGACCGGCCCTTCTTCTGGCTGTTCGAGAACGTGGTGGCCATGGGCGTGAGCGACA
AGCGGGACATCAGCCGGTTCCTGGAGAGCAACCCCGTGATGATCGACGCCAAGGAG
GTGAGCGCCGCCCACCGGGCCCGGTACTTCTGGGGCAACCTGCCCGGCATGAACCG
GCCCCTGGCCAGCACCGTGAACGACAAGCTGGAGCTGCAGGAGTGCCTGGAGCACG
GCCGGATCGCCAAGTTCAGCAAGGTGCGGACCATCACCACCCGGAGCAACAGCATC
AAGCAGGGCAAGGACCAGCACTTCCCCGTGTTCATGAACGAGAAGGAGGACATCCT
GTGGTGCACCGAGATGGAGCGGGTGTTCGGCTTCCCCGTGCACTACACCGACGTGA
GCAACATGAGCCGGCTGGCCCGGCAGCGGCTGCTGGGCCGGAGCTGGAGCGTGCCC
GTGATCCGGCACCTGTTCGCCCCCCTGAAGGAGTACTTCGCCTGCGTGAGCAGCGGC
AACAGCAACGCCAACAGCCGGGGCCCCAGCTTCAGCAGCGGCCTGGTGCCCCTGAG
CCTGCGGGGCAGCCACATGAATCCTCTGGAGATGTTCGAGACAGTGCCCGTGTGGA
GAAGGCAACCCGTGAGGGTGCTGAGCCTCTTCGAGGACATTAAGAAGGAGCTGACC
TCTCTGGGCTTTCTGGAATCCGGCAGCGACCCCGGCCAGCTGAAACACGTGGTGGAC
GTGACCGACACAGTGAGGAAGGACGTGGAAGAGTGGGGCCCCTTTGACCTCGTGTA
TGGAGCCACACCTCCTCTCGGCCACACATGCGATAGGCCTCCCAGCTGGTATCTCTT
CCAGTTCCACAGACTGCTCCAGTACGCCAGACCTAAGCCCGGCAGCCCCAGACCCTT
CTTCTGGATGTTCGTGGACAATCTGGTGCTGAACAAGGAGGATCTGGATGTGGCCAG
CAGATTTCTGGAGATGGAACCCGTGACAATCCCCGACGTGCATGGCGGCTCTCTGCA
GAACGCCGTGAGAGTGTGGTCCAACATCCCCGCCATTAGAAGCAGACACTGGGCTC
TGGTGAGCGAGGAGGAACTGTCTCTGCTGGCCCAGAATAAGCAGTCCTCCAAGCTG
GCCGCCAAGTGGCCCACCAAGCTGGTGAAGAACTGCTTTCTGCCTCTGAGGGAGTAT
TTCAAGTATTTCAGCACCGAACTGACCAGCAGCCTGAGCGGCGGCAAGCGGCCCGC
CGCCACCAAGAAGGCCGGCCAGGCCAAGAAGAAGAAGGGCAGCTACCCCTACGAC
GTGCCCGACTACGCCTGAGCGGCCGCTTAATTAAGCTGCCTTCTGCGGGGCTTGCCT
TCTGGCCATGCCCTTCTTCTCTCCCTTGCACCTGTACCTCTTGGTCTTTGAATAAAGC
CTGAGTAGGAAGTCTAGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA(SEQ ID NO: 70)

В некоторых вариантах осуществления репрессор экспрессии содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 37 или 153. В некоторых вариантах осуществления репрессор экспрессии, описанный в данном документе, содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 37 или последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 99 или 100% идентичностью с ней или имеет не более чем 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 положение, отличающееся от нее.

Белковая последовательность dCas9-DNMT3a/3L

MAPKKKRKVGIHGVPAADKKYSIGLAIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNT
DRHSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFF
HRLEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLAL
AHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSK
SRRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLDNL
LAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKAL
VRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDL
LRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYPFLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNS
RFAWMTRKSEETITPWNFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYFT
VYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDS
VEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIEERLKT
YAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANRNFMQL
IHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGILQTVKVVDELVKVMGRHK
PENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYY
LQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVAAIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKARGKSDNVPSEE
VVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVA
QILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSKLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNA
VVGTALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMIAKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEIT
LANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVLSMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESIL
PKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIM
ERSSFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLASAGELQKGNELALP
SKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVILADANLDK
VLSAYNKHRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQ
SITGLYETRIDLSQLGGDSAGGGGSGGGGSGGGGSGPKKKRKVAAAGSNHDQEFDPPK
VYPPVPAEKRKPIRVLSLFDGIATGLLVLKDLGIQVDRYIASEVCEDSITVGMVRHQGKI
MYVGDVRSVTQKHIQEWGPFDLVIGGSPCNDLSIVNPARKGLYEGTGRLFFEFYRLLHD
ARPKEGDDRPFFWLFENVVAMGVSDKRDISRFLESNPVMIDAKEVSAAHRARYFWGNL
PGMNRPLASTVNDKLELQECLEHGRIAKFSKVRTITTRSNSIKQGKDQHFPVFMNEKEDI
LWCTEMERVFGFPVHYTDVSNMSRLARQRLLGRSWSVPVIRHLFAPLKEYFACVSSGN
SNANSRGPSFSSGLVPLSLRGSHMNPLEMFETVPVWRRQPVRVLSLFEDIKKELTSLGFL
ESGSDPGQLKHVVDVTDTVRKDVEEWGPFDLVYGATPPLGHTCDRPPSWYLFQFHRLL
QYARPKPGSPRPFFWMFVDNLVLNKEDLDVASRFLEMEPVTIPDVHGGSLQNAVRVWS

NIPAIRSRHWALVSEEELSLLAQNKQSSKLAAKWPTKLVKNCFLPLREYFKYFSTELTSS
LSGGKRPAATKKAGQAKKKKGSYPYDVPDYA (SEQ ID NO: 37)

MAPKKKRKVGIHGVPAADKKYSIGLAIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNT
DRHSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFF
HRLEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLAL
AHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSK
SRRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLDNL
LAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKAL
VRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDL
LRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYPFLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNS
RFAWMTRKSEETITPWNFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYFT
VYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDS
VEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIEERLKT
YAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANRNFMQL
IHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGILQTVKVVDELVKVMGRHK
PENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYY
LQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVAAIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKARGKSDNVPSEE
VVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVA
QILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSKLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNA
VVGTALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMIAKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEIT
LANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVLSMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESIL
PKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIM
ERSSFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLASAGELQKGNELALP
SKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVILADANLDK
VLSAYNKHRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQ
SITGLYETRIDLSQLGGDSAGGGGSGGGGSGGGGSGPKKKRKVAAAGSNHDQEFDPPK
VYPPVPAEKRKPIRVLSLFDGIATGLLVLKDLGIQVDRYIASEVCEDSITVGMVRHQGKI
MYVGDVRSVTQKHIQEWGPFDLVIGGSPCNDLSIVNPARKGLYEGTGRLFFEFYRLLHD
ARPKEGDDRPFFWLFENVVAMGVSDKRDISRFLESNPVMIDAKEVSAAHRARYFWGNL
PGMNRPLASTVNDKLELQECLEHGRIAKFSKVRTITTRSNSIKQGKDQHFPVFMNEKEDI
LWCTEMERVFGFPVHYTDVSNMSRLARQRLLGRSWSVPVIRHLFAPLKEYFACVSSGN
SNANSRGPSFSSGLVPLSLRGSHMNPLEMFETVPVWRRQPVRVLSLFEDIKKELTSLGFL
ESGSDPGQLKHVVDVTDTVRKDVEEWGPFDLVYGATPPLGHTCDRPPSWYLFQFHRLL
QYARPKPGSPRPFFWMFVDNLVLNKEDLDVASRFLEMEPVTIPDVHGGSLQNAVRVWS
NIPAIRSRHWALVSEEELSLLAQNKQSSKLAAKWPTKLVKNCFLPLREYFKYFSTELTSS
LSGGKRPAATKKAGQAKKKKGS (SEQ ID NO: 153)

В некоторых вариантах осуществления репрессор экспрессии содержит нацеливающуюся функциональную группу, содержащую домен по типу "Zn-пальца", и эффекторную функциональную группу, содержащую KRAB, например домен KRAB. В некоторых вариантах осуществления репрессоры экспрессии кодируются

последовательностью нуклеиновой кислоты под любым из SEQ ID NO: 55, 56, 57, 58, 59, 60, 189, 194, 195 и 196 (например, нуклеиновая кислота (например, cDNA), кодирующая репрессор экспрессии). Последовательности нуклеиновых кислот данных иллюстративных репрессоров экспрессии раскрыты в таблице 6. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота, описанная в данном документе, содержит последовательность нуклеиновой кислоты под любым из SEQ ID NO: 55-60, 189, 194-196 или последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 99 или 100% идентичностью с ней или имеет не более чем 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 положение, отличающееся от нее. В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты содержит поли-А-последовательность, а в других вариантах осуществления, нуклеиновая кислота не содержит поли-А-последовательность.

Таблица 6. Нуклеотидные последовательности иллюстративных эффекторов ZF-KRAB

| Название | SEQ ID NO: | ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ |
|---|---|---|
| ZF1-KRAB (нт) | 55 | AGGAAATAAGAGAGAAAAGAAGAGTAAGAAGAAATATA<br>AGAGCCACCATGGCCCCCAAGAAGAAGCGGAAGGTGGGC<br>ATCCACGGCGTGCCCGCCGCCGGCAGCAGCGGATCCCTG<br>GAGCCCGGCGAGAAACCCTACAAGTGCCCCGAGTGCGGC<br>AAATCCTTCTCTAGAAGCGACAAACTGACCGAACATCAG<br>AGGACCCACACCGGCGAGAAGCCTTATAAGTGTCCCGAA<br>TGCGGCAAATCCTTCAGCACCAAGAACTCTCTGACAGAAC<br>ACCAGAGAACACATACCGGAGAGAAACCTTATAAATGCC<br>CCGAGTGCGGCAAGTCCTTCTCCCAGTCCGGCGATCTGAG<br>GAGACACCAAAGAACACATACCGGCGAAAAGCCTTACAA<br>GTGCCCCGAGTGTGGAAAGAGCTTCTCCACCACCGGCGCT<br>CTGACCGAGCACCAGAGAACACACACCGGCGAGAAACCC<br>TATAAATGTCCCGAGTGTGGCAAATCCTTCAGCGACAGCG<br>GCAATCTGAGAGTGCACCAAAGAACCCATACCGGCGAAA<br>AACCCTACAAATGCCCCGAGTGCGGCAAATCCTTCAGCCA<br>GAGGGCCCATCTGGAGAGGCACCAAAGGACACACACCGG<br>AGAAAAGCCCTACAAGTGTCCCGAGTGTGGAAAAAGCTT<br>TAGCACAAGCGGCGAGCTGGTGAGGCATCAAAGGACCCA<br>CACCGGCGAAAAGCCCACCGGCAAAAAGACCAGCGCTAG<br>CGGCAGCGGCGGCGGCAGCGGCGGCGACGCCAAGAGCCT |

| | | |
|---|---|---|
| | | GACCGCCTGGAGCCGGACCCTGGTGACCTTCAAGGACGT<br>GTTCGTGGACTTCACCCGGGAGGAGTGGAAGCTGCTGGA<br>CACCGCCCAGCAGATCCTGTACCGGAACGTGATGCTGGA<br>GAACTACAAGAACCTGGTGAGCCTGGGCTACCAGCTGAC<br>CAAGCCCGACGTGATCCTGCGGCTGGAGAAGGGCGAGGA<br>GCCCTGGCTGGTGGAGCGGGAGATCCACCAGGAGACCCA<br>CCCCGACAGCGAGACCGCCTTCGAGATCAAGAGCAGCGT<br>GAGCGGCGGCAAGCGGCCCGCCGCCACCAAGAAGGCCGG<br>CCAGGCCAAGAAGAAGAAGGGCAGCTACCCCTACGACGT<br>GCCCGACTACGCCTGAGCGGCCGCTTAATTAAGCTGCCTT<br>CTGCGGGGCTTGCCTTCTGGCCATGCCCTTCTTCTCTCCCT<br>TGCACCTGTACCTCTTGGTCTTTGAATAAAGCCTGAGTAG<br>GAAGTCTAGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA<br>AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA<br>AAAAAAAAAAAAA |
| ZF2-<br>KRAB<br>(нт) | 56 | AGGAAATAAGAGAGAAAAGAAGAGTAAGAAGAAATATA<br>AGAGCCACCATGGCCCCCAAGAAGAAGCGGAAGGTGGGC<br>ATCCACGGCGTGCCCGCCGCCGGCAGCAGCGGATCCCTG<br>GAGCCCGGCGAGAAGCCCTACAAGTGCCCCGAGTGCGGA<br>AAGTCCTTCAGCTCCCCCGCCGATCTGACAAGACATCAGA<br>GAACCCATACCGGCGAGAAACCTTACAAATGCCCCGAAT<br>GTGGCAAGTCCTTTAGCGATCCCGGACATCTGGTGAGGCA<br>CCAGAGGACACACACCGGCGAAAAGCCCTATAAATGTCC<br>CGAGTGTGGAAAGAGCTTTTCTAGAAGCGACAATCTCGTG<br>AGACACCAGAGAACCCACACCGGAGAGAAGCCTTACAAG<br>TGCCCCGAGTGCGGCAAATCCTTCAGCCAGAGCTCCTCTC<br>TGGTGAGGCACCAAAGGACCCACACCGGCGAGAAACCTT<br>ATAAGTGTCCCGAGTGTGGCAAAAGCTTCAGCACCTCCCA<br>CTCTCTGACCGAGCATCAAAGAACCCACACCGGCGAAAA<br>ACCTTATAAATGCCCCGAGTGTGGCAAATCCTTCAGCAGA<br>AATGACGCTCTGACAGAGCACCAAAGAACACATACCGGA<br>GAAAAGCCCTACAAATGCCCCGAGTGTGGAAAATCCTTTT<br>CTAGAAACGATGCTCTGACCGAACACCAAAGAACACACA<br>CCGGCGAAAAGCCTACCGGAAAAAAGACCAGCGCTAGCG<br>GCAGCGGCGGCGGCAGCGGCGGCGACGCCAAGAGCCTGA |

| | | |
|---|---|---|
| | | CCGCCTGGAGCCGGACCCTGGTGACCTTCAAGGACGTGTT<br>CGTGGACTTCACCCGGGAGGAGTGGAAGCTGCTGGACAC<br>CGCCCAGCAGATCCTGTACCGGAACGTGATGCTGGAGAA<br>CTACAAGAACCTGGTGAGCCTGGGCTACCAGCTGACCAA<br>GCCCGACGTGATCCTGCGGCTGGAGAAGGGCGAGGAGCC<br>CTGGCTGGTGGAGCGGGAGATCCACCAGGAGACCCACCC<br>CGACAGCGAGACCGCCTTCGAGATCAAGAGCAGCGTGAG<br>CGGCGGCAAGCGGCCCGCCGCCACCAAGAAGGCCGGCCA<br>GGCCAAGAAGAAGAAGGGCAGCTACCCCTACGACGTGCC<br>CGACTACGCCTGAGCGGCCGCTTAATTAAGCTGCCTTCTG<br>CGGGGCTTGCCTTCTGGCCATGCCCTTCTTCTCTCCCTTGC<br>ACCTGTACCTCTTGGTCTTTGAATAAAGCCTGAGTAGGAA<br>GTCTAGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA<br>AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA<br>AAAAAAAAAA |
| ZF3-<br>KRAB<br>(нт) | 57 | AGGAAATAAGAGAGAAAAGAAGAGTAAGAAGAAATATA<br>AGAGCCACCATGGCCCCCAAGAAGAAGCGGAAGGTGGGC<br>ATCCACGGCGTGCCCGCCGCCGGCAGCAGCGGATCCCTG<br>GAGCCCGGCGAAAAACCTTACAAGTGCCCCGAGTGCGGA<br>AAGAGCTTCAGCAGAAGCGACAAACTGGTGAGGCATCAA<br>AGGACACATACCGGAGAGAAGCCCTATAAGTGCCCCGAA<br>TGTGGCAAATCCTTTTCCCAGAGGGCTCATCTGGAAAGAC<br>ACCAGAGGACCCATACCGGCGAAAAACCCTACAAATGTC<br>CCGAGTGTGGAAAGAGCTTTTCCGATCCCGGCCATCTGGT<br>CAGACATCAGAGGACACATACCGGCGAAAAGCCTTACAA<br>GTGTCCCGAATGCGGAAAATCCTTCTCCAGAAGCGACAA<br>GCTGGTGAGGCACCAAAGAACCCACACCGGCGAAAAACC<br>CTATAAATGCCCCGAGTGCGGCAAGTCCTTTAGCCAGCTG<br>GCCCATCTGAGAGCCCACCAGAGAACACACACCGGAGAG<br>AAGCCTTATAAGTGTCCCGAGTGCGGAAAGTCCTTCTCTA<br>GAGCCGACAATCTGACCGAACATCAAAGGACACACACCG<br>GCGAGAAACCTTATAAATGCCCCGAGTGCGGAAAAAGCT<br>TTTCCGACTGCAGAGATCTGGCTAGACACCAGAGAACCCA<br>CACCGGCGAGAAACCCACCGGCAAAAAGACCAGCGCTAG<br>CGGCAGCGGCGGCGGCAGCGGCGGCGACGCCAAGAGCCT |

| | | |
|---|---|---|
| | | GACCGCCTGGAGCCGGACCCTGGTGACCTTCAAGGACGT<br>GTTCGTGGACTTCACCCGGGAGGAGTGGAAGCTGCTGGA<br>CACCGCCCAGCAGATCCTGTACCGGAACGTGATGCTGGA<br>GAACTACAAGAACCTGGTGAGCCTGGGCTACCAGCTGAC<br>CAAGCCCGACGTGATCCTGCGGCTGGAGAAGGGCGAGGA<br>GCCCTGGCTGGTGGAGCGGGAGATCCACCAGGAGACCCA<br>CCCCGACAGCGAGACCGCCTTCGAGATCAAGAGCAGCGT<br>GAGCGGCGGCAAGCGGCCCGCCGCCACCAAGAAGGCCGG<br>CCAGGCCAAGAAGAAGAAGGGCAGCTACCCCTACGACGT<br>GCCCGACTACGCCTGAGCGGCCGCTTAATTAAGCTGCCTT<br>CTGCGGGGCTTGCCTTCTGGCCATGCCCTTCTTCTCTCCCT<br>TGCACCTGTACCTCTTGGTCTTTGAATAAAGCCTGAGTAG<br>GAAGTCTAGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA<br>AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA<br>AAAAAAAAAAAAA |
| ZF4-<br>KRAB<br>(нт) | 58 | AGGAAATAAGAGAGAAAAGAAGAGTAAGAAGAAATATA<br>AGAGCCACCATGGCCCCCAAGAAGAAGCGGAAGGTGGGC<br>ATCCACGGCGTGCCCGCCGCCGGCAGCAGCGGATCCCTG<br>GAGCCCGGCGAAAAGCCTTATAAATGTCCCGAATGCGGC<br>AAGAGCTTTAGCCACACCGGCCATCTGCTGGAACACCAA<br>AGGACCCATACCGGCGAAAAGCCCTATAAGTGCCCCGAG<br>TGTGGCAAGAGCTTCAGCACCACCGGCAATCTGACAGTCC<br>ATCAGAGGACCCACACCGGAGAGAAACCCTATAAATGCC<br>CCGAGTGTGGAAAGTCCTTCTCCGACAAGAAGGATCTGAC<br>AAGACACCAGAGGACCCATACCGGCGAGAAACCCTACAA<br>ATGCCCCGAGTGCGGCAAATCCTTCTCCCAGAGCGGCGAT<br>CTGAGGAGACATCAAAGAACACATACCGGCGAAAAACCC<br>TATAAGTGCCCCGAATGCGGCAAGTCCTTCAGCCAGAGG<br>GCCCATCTGGAAAGGCATCAGAGGACACACACCGGCGAG<br>AAGCCTTACAAATGTCCCGAGTGCGGAAAGAGCTTCTCTA<br>GAAGCGACAAGCTGACCGAGCATCAGAGGACCCACACCG<br>GAGAAAAACCTTACAAGTGCCCCGAGTGCGGCAAAAGCT<br>TCAGCAGAACCGACACACTGAGAGATCACCAAAGGACAC<br>ACACCGGCGAGAAACCCACCGGCAAAAAGACCAGCGCTA<br>GCGGCAGCGGCGGCGGCAGCGGCGGCGACGCCAAGAGCC |

| | | |
|---|---|---|
| | | TGACCGCCTGGAGCCGGACCCTGGTGACCTTCAAGGACGT<br>GTTCGTGGACTTCACCCGGGAGGAGTGGAAGCTGCTGGA<br>CACCGCCCAGCAGATCCTGTACCGGAACGTGATGCTGGA<br>GAACTACAAGAACCTGGTGAGCCTGGGCTACCAGCTGAC<br>CAAGCCCGACGTGATCCTGCGGCTGGAGAAGGGCGAGGA<br>GCCCTGGCTGGTGGAGCGGGAGATCCACCAGGAGACCCA<br>CCCCGACAGCGAGACCGCCTTCGAGATCAAGAGCAGCGT<br>GAGCGGCGGCAAGCGGCCCGCCGCCACCAAGAAGGCCGG<br>CCAGGCCAAGAAGAAGAAGGGCAGCTACCCCTACGACGT<br>GCCCGACTACGCCTGAGCGGCCGCTTAATTAAGCTGCCTT<br>CTGCGGGGCTTGCCTTCTGGCCATGCCCTTCTTCTCTCCCT<br>TGCACCTGTACCTCTTGGTCTTTGAATAAAGCCTGAGTAG<br>GAAGTCTAGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA<br>AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA<br>AAAAAAAAAAAAA |
| ZF5-<br>KRAB<br>(нт) | 59 | AGGAAATAAGAGAGAAAAGAAGAGTAAGAAGAAATATA<br>AGAGCCACCATGGCCCCCAAGAAGAAGCGGAAGGTGGGC<br>ATCCACGGCGTGCCCGCCGCCGGCAGCAGCGGATCCCTG<br>GAGCCCGGCGAGAAGCCTTATAAGTGCCCCGAGTGTGGC<br>AAGAGCTTTAGCCACACCGGCCATCTGCTGGAGCATCAAA<br>GGACACACACCGGAGAAAAGCCCTATAAGTGCCCCGAGT<br>GTGGCAAATCCTTCAGCACCTCCGGCAATCTCACCGAACA<br>CCAGAGAACACACACCGGAGAAAAACCTTACAAATGTCC<br>CGAGTGTGGAAAGAGCTTTTCCACCAGCGGCAATCTGGTG<br>AGACATCAAAGAACACATACCGGCGAAAAACCCTATAAA<br>TGCCCCGAGTGTGGAAAATCCTTCTCCCAACTGGCCCATC<br>TGAGGGCCCACCAGAGGACACATACCGGAGAAAAACCCT<br>ACAAATGCCCCGAATGCGGAAAAAGCTTCTCCGAGAGAA<br>GCCATCTGAGAGAGCACCAAAGGACCCATACCGGAGAAA<br>AGCCTTACAAGTGTCCCGAGTGCGGAAAAAGCTTTAGCG<br>ATCCCGGACATCTGGTGAGACATCAGAGAACCCACACCG<br>GCGAAAAGCCTTATAAATGTCCCGAATGTGGCAAGTCCTT<br>TAGCACCCATCTGGATCTGATTAGACACCAAAGAACCCAC<br>ACCGGCGAGAAACCCACCGGAAAAAAGACCAGCGCTAGC<br>GGCAGCGGCGGCGGCAGCGGCGGCGACGCCAAGAGCCTG |

| | | |
|---|---|---|
| | | ACCGCCTGGAGCCGGACCCTGGTGACCTTCAAGGACGTGT<br>TCGTGGACTTCACCCGGGAGGAGTGGAAGCTGCTGGACA<br>CCGCCCAGCAGATCCTGTACCGGAACGTGATGCTGGAGA<br>ACTACAAGAACCTGGTGAGCCTGGGCTACCAGCTGACCA<br>AGCCCGACGTGATCCTGCGGCTGGAGAAGGGCGAGGAGC<br>CCTGGCTGGTGGAGCGGGAGATCCACCAGGAGACCCACC<br>CCGACAGCGAGACCGCCTTCGAGATCAAGAGCAGCGTGA<br>GCGGCGGCAAGCGGCCCGCCGCCACCAAGAAGGCCGGCC<br>AGGCCAAGAAGAAGAAGGGCAGCTACCCCTACGACGTGC<br>CCGACTACGCCTGAGCGGCCGCTTAATTAAGCTGCCTTCT<br>GCGGGGCTTGCCTTCTGGCCATGCCCTTCTTCTCTCCCTTG<br>CACCTGTACCTCTTGGTCTTTGAATAAAGCCTGAGTAGGA<br>AGTCTAGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA<br>AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA<br>AAAAAAAAAAA |
| ZF6-<br>KRAB<br>(НТ) | 60 | AGGAAATAAGAGAGAAAAGAAGAGTAAGAAGAAATATA<br>AGAGCCACCATGGCCCCCAAGAAGAAGCGGAAGGTGGGC<br>ATCCACGGCGTGCCCGCCGCCGGCAGCAGCGGATCCCTG<br>GAGCCCGGCGAAAAGCCTTACAAATGTCCCGAGTGCGGA<br>AAGTCCTTCAGCGACCCCGGCGCTCTGGTGAGACATCAAA<br>GAACACATACCGGCGAGAAACCTTATAAATGCCCCGAAT<br>GTGGAAAATCCTTCAGCGAAAGAAGCCATCTGAGGGAAC<br>ACCAGAGGACCCACACCGGCGAAAAACCTTATAAGTGCC<br>CCGAATGCGGAAAAAGCTTTTCTAGAAGCGATCATCTGAC<br>CAACCATCAGAGAACACACACCGGCGAAAAGCCCTATAA<br>ATGTCCCGAGTGTGGCAAATCCTTTAGCGAGAGGTCCCAT<br>CTGAGAGAGCACCAGAGGACACATACCGGAGAGAAGCCC<br>TACAAGTGCCCCGAGTGTGGCAAGAGCTTTAGCAGAAGC<br>GACCATCTGACCAATCATCAAAGGACCCACACCGGAGAG<br>AAGCCTTACAAGTGTCCCGAGTGCGGAAAGTCCTTTTCCG<br>ATCCCGGCCACCTCGTGAGGCACCAAAGAACCCATACCG<br>GCGAGAAACCCTACAAATGCCCCGAGTGTGGAAAGAGCT<br>TCTCCAGAAGCGACAAGCTGGTGAGGCATCAGAGGACAC<br>ACACCGGCGAAAAACCCACCGGCAAGAAAACCAGCGCTA<br>GCGGCAGCGGCGGCGGCAGCGGCGGCGACGCCAAGAGCC |

| | | |
|---|---|---|
| | | TGACCGCCTGGAGCCGGACCCTGGTGACCTTCAAGGACGT<br>GTTCGTGGACTTCACCCGGGAGGAGTGGAAGCTGCTGGA<br>CACCGCCCAGCAGATCCTGTACCGGAACGTGATGCTGGA<br>GAACTACAAGAACCTGGTGAGCCTGGGCTACCAGCTGAC<br>CAAGCCCGACGTGATCCTGCGGCTGGAGAAGGGCGAGGA<br>GCCCTGGCTGGTGGAGCGGGAGATCCACCAGGAGACCCA<br>CCCCGACAGCGAGACCGCCTTCGAGATCAAGAGCAGCGT<br>GAGCGGCGGCAAGCGGCCCGCCGCCACCAAGAAGGCCGG<br>CCAGGCCAAGAAGAAGAAGGGCAGCTACCCCTACGACGT<br>GCCCGACTACGCCTGAGCGGCCGCTTAATTAAGCTGCCTT<br>CTGCGGGGCTTGCCTTCTGGCCATGCCCTTCTTCTCTCCCT<br>TGCACCTGTACCTCTTGGTCTTTGAATAAAGCCTGAGTAG<br>GAAGTCTAGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA<br>AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA<br>AAAAAAAAAAAAA |
| ZF54-<br>KRAB | 189 | AGGAAATAAGAGAGAAAAGAAGAGTAAGAAGAAATATA<br>AGAGCCACCATGGCCCCCAAGAAGAAGCGGAAGGTGGGC<br>ATCCACGGCGTGCCCGCCGCCGGCAGCAGCGGATCCCTG<br>GAGCCTGGAGAGAAACCCTACAAATGCCCGGAATGCGGG<br>AAGTCCTTTTCCGAACGCTCGCACCTGAGGGAACACCAGA<br>GAACTCACACCGGCGAAAAACCCTATAAGTGCCCAGAAT<br>GCGGAAAGAGCTTTTCACGGTCGGACAACCTCGTGCGGC<br>ACCAACGCACTCATACCGGAGAGAAGCCGTACAAGTGTC<br>CTGAGTGCGGAAAGTCATTCTCCGACTGCCGGGATTTGGC<br>CCGCCACCAAAGAACACACACTGGCGAAAAGCCCTACAA<br>GTGCCCGGAGTGTGGAAAGTCCTTCAGCACTTCCGGAGAG<br>CTGGTCCGGCACCAGAGGACCCACACCGGGGAGAAGCCT<br>TACAAATGTCCAGAGTGCGGTAAAAGCTTCTCCACCACCG<br>GCAACCTCACCGTGCACCAGCGGACCCACACTGGAGAAA<br>AGCCGTATAAATGCCCCGAATGCGGCAAGAGCTTCTCGCG<br>ATCCGATAAGCTTGTGCGGCATCAGAGAACGCACACTGG<br>GGAAAAGCCTTATAAGTGTCCGGAGTGCGGCAAATCCTTC<br>TCCCGCACTGACACCCTGCGGGACCATCAGCGCACCCATA<br>CCGGCAAAAAGACCTCTGCTAGCGGCAGCGGCGGCGGCA<br>GCGGCGGCGCCCGGGACGACGCCAAGAGCCTGACCGCCT |

| | | |
|---|---|---|
| | | GGAGCCGGACCCTGGTGACCTTCAAGGACGTGTTCGTGGA<br>CTTCACCCGGGAGGAGTGGAAGCTGCTGGACACCGCCCA<br>GCAGATCCTGTACCGGAACGTGATGCTGGAGAACTACAA<br>GAACCTGGTGAGCCTGGGCTACCAGCTGACCAAGCCCGA<br>CGTGATCCTGCGGCTGGAGAAGGGCGAGGAGCCCTGGCT<br>GGTGGAGCGGGAGATCCACCAGGAAACCCACCCCGACAG<br>CGAAACCGCCTTCGAGATCAAGAGCAGCGTGCCCAGCAG<br>CGGCGGCAAGCGGCCCGCCGCCACCAAGAAGGCCGGCCA<br>GGCCAAGAAGAAGAAGGGCAGCTACCCCTACGACGTGCC<br>CGACTACGCCTGAGCGGCCGCTTAATTAAGCTGCCTTCTG<br>CGGGGCTTGCCTTCTGGCCATGCCCTTCTTCTCTCCCTTGC<br>ACCTGTACCTCTTGGTCTTTGAATAAAGCCTGAGTAGGAA<br>GTCTAGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA<br>AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA<br>AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA<br>AAA |
| ZF61-<br>KRAB | 193 | AGGAAATAAGAGAGAAAAGAAGAGTAAGAAGAAATATA<br>AGAGCCACCATGGCCCCCAAGAAGAAGCGGAAGGTGGGC<br>ATCCACGGCGTGCCCGCCGCCGGCAGCAGCGGATCCCTTG<br>AACCCGGGGAGAAGCCCTACAAGTGCCCGGAATGCGGAA<br>AGAGCTTCAGCCAGAAGTCCTCGCTGATCGCGCACCAGA<br>GGACTCACACCGGCGAAAAGCCATACAAGTGTCCTGAGT<br>GTGGCAAATCCTTCTCGCACAAGAACGCACTGCAGAACC<br>ACCAGAGAACCCACACCGGGGAAAAGCCGTATAAGTGCC<br>CCGAATGTGGAAAGTCGTTCAGCCAGTCATCCAACCTCGT<br>GCGCCATCAAAGGACTCATACCGGAGAGAAACCTTACAA<br>ATGCCCTGAATGCGGCAAATCTTTCTCCCGGAATGATGCC<br>CTGACCGAGCACCAGCGCACTCACACGGGAGAGAAGCCG<br>TACAAATGTCCGGAGTGCGGAAAGTCCTTCTCCGACAAGA<br>AGGACTTGACCAGACACCAGCGGACCCATACTGGCGAAA<br>AACCCTATAAGTGTCCAGAGTGCGGGAAGTCCTTTAGCCA<br>AGCCGGTCACCTCGCTTCCCACCAACGGACCCACACAGGA<br>GAAAAGCCTTATAAATGCCCCGAGTGCGGCAAAAGCTTCT<br>CCGATAAGAAGGACCTGACTCGGCATCAGCGCACCCATA<br>CCGGAAAGAAAACCTCAGCTAGCGGCAGCGGCGGCGGCA |

| | | |
|---|---|---|
| | | GCGGCGGCGCCCGGGACGACGCCAAGAGCCTGACCGCCT<br>GGAGCCGGACCCTGGTGACCTTCAAGGACGTGTTCGTGGA<br>CTTCACCCGGGAGGAGTGGAAGCTGCTGGACACCGCCCA<br>GCAGATCCTGTACCGGAACGTGATGCTGGAGAACTACAA<br>GAACCTGGTGAGCCTGGGCTACCAGCTGACCAAGCCCGA<br>CGTGATCCTGCGGCTGGAGAAGGGCGAGGAGCCCTGGCT<br>GGTGGAGCGGGAGATCCACCAGGAAACCCACCCCGACAG<br>CGAAACCGCCTTCGAGATCAAGAGCAGCGTGCCCAGCAG<br>CGGCGGCAAGCGGCCCGCCGCCACCAAGAAGGCCGGCCA<br>GGCCAAGAAGAAGAAGGGCAGCTACCCCTACGACGTGCC<br>CGACTACGCCTGAGCGGCCGCTTAATTAAGCTGCCTTCTG<br>CGGGGCTTGCCTTCTGGCCATGCCCTTCTTCTCTCCCTTGC<br>ACCTGTACCTCTTGGTCTTTGAATAAAGCCTGAGTAGGAA<br>GTCTAGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA<br>AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA<br>AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA<br>AAA |
| ZF67-<br>KRAB | 194 | AGGAAATAAGAGAGAAAAGAAGAGTAAGAAGAAATATA<br>AGAGCCACCATGGCCCCCAAGAAGAAGCGGAAGGTGGGC<br>ATCCACGGCGTGCCCGCCGCCGGCAGCAGCGGATCCCTG<br>GAGCCTGGCGAAAAACCCTATAAGTGCCCAGAATGCGGA<br>AAGAGCTTTTCACGGTCGGACAACCTCGTGCGGCACCAAC<br>GCACTCATACCGGAGAGAAGCCGTACAAGTGTCCTGAGT<br>GCGGAAAGTCATTCTCCGACTGCCGGGATTTGGCCCGCCA<br>CCAAAGAACACACACTGGCGAAAAGCCCTACAAGTGCCC<br>GGAGTGTGGAAAGTCCTTCAGCACTTCCGGAGAGCTGGTC<br>CGGCACCAGAGGACCCACACCGGGGAGAAGCCTTACAAA<br>TGTCCAGAGTGCGGTAAAAGCTTCTCCACCACCGGCAACC<br>TCACCGTGCACCAGCGGACCCACACTGGAGAAAAGCCGT<br>ATAAATGCCCCGAATGCGGCAAGAGCTTCTCGCGATCCGA<br>TAAGCTTGTGCGGCATCAGAGAACGCACACTGGGGAAAA<br>GCCTTATAAGTGTCCGGAGTGCGGCAAATCCTTCTCCCGC<br>ACTGACACCCTGCGGGACCACCAGAGAACCCATACTGGC<br>GAGAAGCCATACAAATGCCCGGAATGTGGAAAGAGTTTC<br>TCGCGCGAGGACAACCTCCACACCCATCAGCGCACCCATA |

| | | |
|---|---|---|
| | | CCGGCAAAAAGACCTCTGCTAGCGGCAGCGGCGGCGGCA<br>GCGGCGGCGCCCGGGACGACGCCAAGAGCCTGACCGCCT<br>GGAGCCGGACCCTGGTGACCTTCAAGGACGTGTTCGTGGA<br>CTTCACCCGGGAGGAGTGGAAGCTGCTGGACACCGCCCA<br>GCAGATCCTGTACCGGAACGTGATGCTGGAGAACTACAA<br>GAACCTGGTGAGCCTGGGCTACCAGCTGACCAAGCCCGA<br>CGTGATCCTGCGGCTGGAGAAGGGCGAGGAGCCCTGGCT<br>GGTGGAGCGGGAGATCCACCAGGAAACCCACCCCGACAG<br>CGAAACCGCCTTCGAGATCAAGAGCAGCGTGCCCAGCAG<br>CGGCGGCAAGCGGCCCGCCGCCACCAAGAAGGCCGGCCA<br>GGCCAAGAAGAAGAAGGGCAGCTACCCCTACGACGTGCC<br>CGACTACGCCTGAGCGGCCGCTTAATTAAGCTGCCTTCTG<br>CGGGGCTTGCCTTCTGGCCATGCCCTTCTTCTCTCCCTTGC<br>ACCTGTACCTCTTGGTCTTTGAATAAAGCCTGAGTAGGAA<br>GTCTAGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA<br>AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA<br>AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA<br>AAA |
| ZF68-<br>KRAB | 195 | AGGAAATAAGAGAGAAAAGAAGAGTAAGAAGAAATATA<br>AGAGCCACCATGGCCCCCAAGAAGAAGCGGAAGGTGGGC<br>ATCCACGGCGTGCCCGCCGCCGGCAGCAGCGGATCCCTG<br>GAACCCGGAGAGAAACCCTACAAATGCCCAGAGTGCGGC<br>AAATCGTTCTCACGGTCCGATCACCTCACCACCCACCAGA<br>GGACCCATACCGGGGAGAAGCCTTACAAGTGTCCTGAGT<br>GTGGAAAGTCCTTCAGCCAAAAGTCCTCGCTGATCGCACA<br>CCAGCGCACGCACACTGGGGAAAAGCCATATAAATGCCC<br>GGAGTGTGGCAAATCCTTCTCCCGCCGCGACGAACTGAAC<br>GTGCACCAGAGAACCCACACTGGAGAGAAGCCGTATAAG<br>TGTCCGGAGTGCGGAAAGAGCTTCTCGCAATCCGGGGAC<br>CTTCGGAGACATCAGAGGACACACACTGGCGAAAAGCCC<br>TATAAGTGCCCTGAGTGCGGGAAGTCCTTTAGCCAAGCCG<br>GTCACCTGGCCTCCCACCAACGGACTCACACCGGCGAAA<br>AACCGTACAAGTGCCCCGAATGCGGAAAGTCGTTCTCTAC<br>CTCCGGAAACTTGACCGAACACCAGCGGACCCACACCGG<br>AGAAAAGCCGTACAAATGTCCTGAATGCGGCAAAAGCTT |

| | | |
|---|---|---|
| | | CAGCCAGGCCGGTCATCTCGCGAGCCATCAGCGGACTCAT<br>ACTGGCAAAAAGACCTCAGCTAGCGGCAGCGGCGGCGGC<br>AGCGGCGGCGCCCGGGACGACGCCAAGAGCCTGACCGCC<br>TGGAGCCGGACCCTGGTGACCTTCAAGGACGTGTTCGTGG<br>ACTTCACCCGGGAGGAGTGGAAGCTGCTGGACACCGCCC<br>AGCAGATCCTGTACCGGAACGTGATGCTGGAGAACTACA<br>AGAACCTGGTGAGCCTGGGCTACCAGCTGACCAAGCCCG<br>ACGTGATCCTGCGGCTGGAGAAGGGCGAGGAGCCCTGGC<br>TGGTGGAGCGGGAGATCCACCAGGAAACCCACCCCGACA<br>GCGAAACCGCCTTCGAGATCAAGAGCAGCGTGCCCAGCA<br>GCGGCGGCAAGCGGCCCGCCGCCACCAAGAAGGCCGGCC<br>AGGCCAAGAAGAAGAAGGGCAGCTACCCCTACGACGTGC<br>CCGACTACGCCTGAGCGGCCGCTTAATTAAGCTGCCTTCT<br>GCGGGGCTTGCCTTCTGGCCATGCCCTTCTTCTCTCCCTTG<br>CACCTGTACCTCTTGGTCTTTGAATAAAGCCTGAGTAGGA<br>AGTCTAGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA<br>AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA<br>AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA<br>AAAA |

В некоторых вариантах осуществления репрессор экспрессии содержит нацеливающуюся функциональную группу, содержащую домен по типу "Zn-пальца" (например, содержащий аминокислотную последовательность в соответствии с любым из SEQ ID NO: 5-10 или 169-172), и эффекторную функциональную группу, содержащую KRAB (например, аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18), например домен KRAB. В некоторых вариантах осуществления репрессор экспрессии, описанный в данном документе, содержит аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 22, 23, 24, 25, 26, 27, 139-144, 177-180 или 183-186. Белковая последовательность данных иллюстративных репрессоров экспрессии раскрыта в таблице 7. В некоторых вариантах осуществления репрессор экспрессии, описанный в данном документе, содержит аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 22-27, 139-144, 177-180, 183-186 или последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 99 или 100% идентичностью с ней или имеет не более чем 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 положение, отличающееся от нее.

Таблица 7. Аминокислотные последовательности иллюстративных эффекторов "цинковые пальцы"-KRAB

| Название | SEQ ID NO: | ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ |
|---|---|---|

| | | |
|---|---|---|
| ZF1-KRAB (а. к.) | 22 | MAPKKKRKVGIHGVPAAGSSGSLEPGEKPYKCPECGKSFSRSD KLTEHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSTKNSLTEHQRTHTGEKPY KCPECGKSFSQSGDLRRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSTTGAL TEHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSDSGNLRVHQRTHTGEKPYK CPECGKSFSQRAHLERHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSTSGELV RHQRTHTGEKPTGKKTSASGSGGGSGGDAKSLTAWSRTLVTF KDVFVDFTREEWKLLDTAQQILYRNVMLENYKNLVSLGYQLT KPDVILRLEKGEEPWLVEREIHQETHPDSETAFEIKSSVSGGKR PAATKKAGQAKKKKGSYPYDVPDYA |
| ZF2-KRAB (а. к.) | 23 | MAPKKKRKVGIHGVPAAGSSGSLEPGEKPYKCPECGKSFSSPA DLTRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSDPGHLVRHQRTHTGEKP YKCPECGKSFSRSDNLVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQSSS LVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSTSHSLTEHQRTHTGEKPYK CPECGKSFSRNDALTEHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSRNDALT EHQRTHTGEKPTGKKTSASGSGGGSGGDAKSLTAWSRTLVTF KDVFVDFTREEWKLLDTAQQILYRNVMLENYKNLVSLGYQLT KPDVILRLEKGEEPWLVEREIHQETHPDSETAFEIKSSVSGGKR PAATKKAGQAKKKKGSYPYDVPDYA |
| ZF3-KRAB (а. к.) | 24 | MAPKKKRKVGIHGVPAAGSSGSLEPGEKPYKCPECGKSFSRSD KLVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQRAHLERHQRTHTGEKP YKCPECGKSFSDPGHLVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSRSDK LVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQLAHLRAHQRTHTGEKPY KCPECGKSFSRADNLTEHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSDCRDL ARHQRTHTGEKPTGKKTSASGSGGGSGGDAKSLTAWSRTLVT FKDVFVDFTREEWKLLDTAQQILYRNVMLENYKNLVSLGYQL TKPDVILRLEKGEEPWLVEREIHQETHPDSETAFEIKSSVSGGK RPAATKKAGQAKKKKGSYPYDVPDYA |
| ZF4-KRAB (а. к.) | 25 | MAPKKKRKVGIHGVPAAGSSGSLEPGEKPYKCPECGKSFSHTG HLLEHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSTTGNLTVHQRTHTGEKPY KCPECGKSFSDKKDLTRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQSGDL RRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQRAHLERHQRTHTGEKPYK CPECGKSFSRSDKLTEHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSRTDTLR DHQRTHTGEKPTGKKTSASGSGGGSGGDAKSLTAWSRTLVTF KDVFVDFTREEWKLLDTAQQILYRNVMLENYKNLVSLGYQLT KPDVILRLEKGEEPWLVEREIHQETHPDSETAFEIKSSVSGGKR |

| | | |
|---|---|---|
| | | PAATKKAGQAKKKKGSYPYDVPDYA |
| ZF5-KRAB (а. к.) | 26 | MAPKKKRKVGIHGVPAAGSSGSLEPGEKPYKCPECGKSFSHTG<br>HLLEHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSTSGNLTEHQRTHTGEKPY<br>KCPECGKSFSTSGNLVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQLAHL<br>RAHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSERSHLREHQRTHTGEKPYK<br>CPECGKSFSDPGHLVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSTHLDLI<br>RHQRTHTGEKPTGKKTSASGSGGGSGGDAKSLTAWSRTLVTF<br>KDVFVDFTREEWKLLDTAQQILYRNVMLENYKNLVSLGYQLT<br>KPDVILRLEKGEEPWLVEREIHQETHPDSETAFEIKSSVSGGKR<br>PAATKKAGQAKKKKGSYPYDVPDYA |
| ZF6-KRAB (а. к.) | 27 | MAPKKKRKVGIHGVPAAGSSGSLEPGEKPYKCPECGKSFSDPG<br>ALVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSERSHLREHQRTHTGEKPY<br>KCPECGKSFSRSDHLTNHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSERSHL<br>REHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSRSDHLTNHQRTHTGEKPYK<br>CPECGKSFSDPGHLVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSRSDKLV<br>RHQRTHTGEKPTGKKTSASGSGGGSGGDAKSLTAWSRTLVTF<br>KDVFVDFTREEWKLLDTAQQILYRNVMLENYKNLVSLGYQLT<br>KPDVILRLEKGEEPWLVEREIHQETHPDSETAFEIKSSVSGGKR<br>PAATKKAGQAKKKKGSYPYDVPDYA |
| Фрагмент 3 tPT2A+ZF3-KRAB | 134 | PLEGSSGSGSPKKKRKVGIHGVPAAGSSGSLEPGEKPYKCPEC<br>GKSFSRSDKLVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQRAHLERHQ<br>RTHTGEKPYKCPECGKSFSDPGHLVRHQRTHTGEKPYKCPEC<br>GKSFSRSDKLVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQLAHLRAHQ<br>RTHTGEKPYKCPECGKSFSRADNLTEHQRTHTGEKPYKCPECG<br>KSFSDCRDLARHQRTHTGEKPTGKKTSASGSGGGSGGDAKSL<br>TAWSRTLVTFKDVFVDFTREEWKLLDTAQQILYRNVMLENYK<br>NLVSLGYQLTKPDVILRLEKGEEPWLVEREIHQETHPDSETAFE<br>IKSSVSGGKRPAATKKAGQAKKKKGS |

| | | |
|---|---|---|
| ZF1-KRAB без HA (а. к.) | 139 | MAPKKKRKVGIHGVPAAGSSGSLEPGEKPYKCPECGKSFSRSD KLTEHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSTKNSLTEHQRTHTGEKPY KCPECGKSFSQSGDLRRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSTTGAL TEHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSDSGNLRVHQRTHTGEKPYK CPECGKSFSQRAHLERHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSTSGELV RHQRTHTGEKPTGKKTSASGSGGGSGGDAKSLTAWSRTLVTF KDVFVDFTREEWKLLDTAQQILYRNVMLENYKNLVSLGYQLT KPDVILRLEKGEEPWLVEREIHQETHPDSETAFEIKSSVSGGKR PAATKKAGQAKKKKGS |
| ZF2-KRAB без HA (а. к.) | 140 | MAPKKKRKVGIHGVPAAGSSGSLEPGEKPYKCPECGKSFSSPA DLTRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSDPGHLVRHQRTHTGEKP YKCPECGKSFSRSDNLVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQSSS LVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSTSHSLTEHQRTHTGEKPYK CPECGKSFSRNDALTEHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSRNDALT EHQRTHTGEKPTGKKTSASGSGGGSGGDAKSLTAWSRTLVTF KDVFVDFTREEWKLLDTAQQILYRNVMLENYKNLVSLGYQLT KPDVILRLEKGEEPWLVEREIHQETHPDSETAFEIKSSVSGGKR PAATKKAGQAKKKKGS |
| ZF3-KRAB без HA (а. к.) | 141 | MAPKKKRKVGIHGVPAAGSSGSLEPGEKPYKCPECGKSFSRSD KLVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQRAHLERHQRTHTGEKP YKCPECGKSFSDPGHLVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSRSDK LVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQLAHLRAHQRTHTGEKPY KCPECGKSFSRADNLTEHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSDCRDL ARHQRTHTGEKPTGKKTSASGSGGGSGGDAKSLTAWSRTLVT FKDVFVDFTREEWKLLDTAQQILYRNVMLENYKNLVSLGYQL TKPDVILRLEKGEEPWLVEREIHQETHPDSETAFEIKSSVSGGK RPAATKKAGQAKKKKGS |
| ZF4-KRAB без HA (а. к.) | 142 | MAPKKKRKVGIHGVPAAGSSGSLEPGEKPYKCPECGKSFSHTG HLLEHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSTTGNLTVHQRTHTGEKPY KCPECGKSFSDKKDLTRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQSGDL RRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQRAHLERHQRTHTGEKPYK CPECGKSFSRSDKLTEHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSRTDTLR DHQRTHTGEKPTGKKTSASGSGGGSGGDAKSLTAWSRTLVTF KDVFVDFTREEWKLLDTAQQILYRNVMLENYKNLVSLGYQLT KPDVILRLEKGEEPWLVEREIHQETHPDSETAFEIKSSVSGGKR |

| | | |
|---|---|---|
| | | PAATKKAGQAKKKKGS |
| ZF5-KRAB без HA (а. к.) | 143 | MAPKKKRKVGIHGVPAAGSSGSLEPGEKPYKCPECGKSFSHTG<br>HLLEHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSTSGNLTEHQRTHTGEKPY<br>KCPECGKSFSTSGNLVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQLAHL<br>RAHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSERSHLREHQRTHTGEKPYK<br>CPECGKSFSDPGHLVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSTHLDLI<br>RHQRTHTGEKPTGKKTSASGSGGGSGGDAKSLTAWSRTLVTF<br>KDVFVDFTREEWKLLDTAQQILYRNVMLENYKNLVSLGYQLT<br>KPDVILRLEKGEEPWLVEREIHQETHPDSETAFEIKSSVSGGKR<br>PAATKKAGQAKKKKGS |
| ZF6-KRAB без HA (а. к.) | 144 | MAPKKKRKVGIHGVPAAGSSGSLEPGEKPYKCPECGKSFSDPG<br>ALVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSERSHLREHQRTHTGEKPY<br>KCPECGKSFSRSDHLTNHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSERSHL<br>REHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSRSDHLTNHQRTHTGEKPYK<br>CPECGKSFSDPGHLVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSRSDKLV<br>RHQRTHTGEKPTGKKTSASGSGGGSGGDAKSLTAWSRTLVTF<br>KDVFVDFTREEWKLLDTAQQILYRNVMLENYKNLVSLGYQLT<br>KPDVILRLEKGEEPWLVEREIHQETHPDSETAFEIKSSVSGGKR<br>PAATKKAGQAKKKKGS |
| ZF54-KRAB, а. к. | 177 | MAPKKKRKVGIHGVPAAGSSGSLEPGEKPYKCPECGKSFSERS<br>HLREHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSRSDNLVRHQRTHTGEKP<br>YKCPECGKSFSDCRDLARHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSTSGE<br>LVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSTTGNLTVHQRTHTGEKPY<br>KCPECGKSFSRSDKLVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSRTDTL<br>RDHQRTHTGKKTSASGSGGGSGGARDDAKSLTAWSRTLVTFK<br>DVFVDFTREEWKLLDTAQQILYRNVMLENYKNLVSLGYQLTK<br>PDVILRLEKGEEPWLVEREIHQETHPDSETAFEIKSSVPSSGGKR<br>PAATKKAGQAKKKKGSYPYDVPDYA |

| | | |
|---|---|---|
| ZF61-KRAB, а. к. | 178 | MAPKKKRKVGIHGVPAAGSSGSLEPGEKPYKCPECGKSFSQKS<br>SLIAHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSHKNALQNHQRTHTGEKPY<br>KCPECGKSFSQSSNLVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSRNDAL<br>TEHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSDKKDLTRHQRTHTGEKPYK<br>CPECGKSFSQAGHLASHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSDKKDLT<br>RHQRTHTGKKTSASGSGGGSGGARDDAKSLTAWSRTLVTFKD<br>VFVDFTREEWKLLDTAQQILYRNVMLENYKNLVSLGYQLTKP<br>DVILRLEKGEEPWLVEREIHQETHPDSETAFEIKSSVPSSGGKRP<br>AATKKAGQAKKKKGSYPYDVPDYA |
| ZF67-KRAB, а. к. | 179 | MAPKKKRKVGIHGVPAAGSSGSLEPGEKPYKCPECGKSFSRSD<br>NLVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSDCRDLARHQRTHTGEKP<br>YKCPECGKSFSTSGELVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSTTGN<br>LTVHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSRSDKLVRHQRTHTGEKPY<br>KCPECGKSFSRTDTLRDHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSREDNL<br>HTHQRTHTGKKTSASGSGGGSGGARDDAKSLTAWSRTLVTFK<br>DVFVDFTREEWKLLDTAQQILYRNVMLENYKNLVSLGYQLTK<br>PDVILRLEKGEEPWLVEREIHQETHPDSETAFEIKSSVPSSGGKR<br>PAATKKAGQAKKKKGSYPYDVPDYA |
| ZF68-KRAB, а. к. | 180 | MAPKKKRKVGIHGVPAAGSSGSLEPGEKPYKCPECGKSFSRSD<br>HLTTHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQKSSLIAHQRTHTGEKPY<br>KCPECGKSFSRRDELNVHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQSGDL<br>RRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQAGHLASHQRTHTGEKPYK<br>CPECGKSFSTSGNLTEHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQAGHLA<br>SHQRTHTGKKTSASGSGGGSGGARDDAKSLTAWSRTLVTFKD<br>VFVDFTREEWKLLDTAQQILYRNVMLENYKNLVSLGYQLTKP<br>DVILRLEKGEEPWLVEREIHQETHPDSETAFEIKSSVPSSGGKRP<br>AATKKAGQAKKKKGSYPYDVPDYA |
| ZF54-KRAB, а. к., без HA-метки | 183 | MAPKKKRKVGIHGVPAAGSSGSLEPGEKPYKCPECGKSFSERS<br>HLREHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSRSDNLVRHQRTHTGEKP<br>YKCPECGKSFSDCRDLARHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSTSGE<br>LVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSTTGNLTVHQRTHTGEKPY<br>KCPECGKSFSRSDKLVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSRTDTL<br>RDHQRTHTGKKTSASGSGGGSGGARDDAKSLTAWSRTLVTFK<br>DVFVDFTREEWKLLDTAQQILYRNVMLENYKNLVSLGYQLTK<br>PDVILRLEKGEEPWLVEREIHQETHPDSETAFEIKSSVPSSGGKR |

| | | |
|---|---|---|
| | | PAATKKAGQAKKKKGS |
| ZF61-KRAB, а. к., без HA-метки | 184 | MAPKKKRKVGIHGVPAAGSSGSLEPGEKPYKCPECGKSFSQKS<br>SLIAHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSHKNALQNHQRTHTGEKPY<br>KCPECGKSFSQSSNLVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSRNDAL<br>TEHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSDKKDLTRHQRTHTGEKPYK<br>CPECGKSFSQAGHLASHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSDKKDLT<br>RHQRTHTGKKTSASGSGGGSGGARDDAKSLTAWSRTLVTFKD<br>VFVDFTREEWKLLDTAQQILYRNVMLENYKNLVSLGYQLTKP<br>DVILRLEKGEEPWLVEREIHQETHPDSETAFEIKSSVPSSGGKRP<br>AATKKAGQAKKKKGS |
| ZF67-KRAB, а. к., без HA-метки | 185 | MAPKKKRKVGIHGVPAAGSSGSLEPGEKPYKCPECGKSFSRSD<br>NLVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSDCRDLARHQRTHTGEKP<br>YKCPECGKSFSTSGELVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSTTGN<br>LTVHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSRSDKLVRHQRTHTGEKPY<br>KCPECGKSFSRTDTLRDHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSREDNL<br>HTHQRTHTGKKTSASGSGGGSGGARDDAKSLTAWSRTLVTFK<br>DVFVDFTREEWKLLDTAQQILYRNVMLENYKNLVSLGYQLTK<br>PDVILRLEKGEEPWLVEREIHQETHPDSETAFEIKSSVPSSGGKR<br>PAATKKAGQAKKKKGS |
| ZF68-KRAB, а. к., без HA-метки | 186 | MAPKKKRKVGIHGVPAAGSSGSLEPGEKPYKCPECGKSFSRSD<br>HLTTHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQKSSLIAHQRTHTGEKPY<br>KCPECGKSFSRRDELNVHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQSGDL<br>RRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQAGHLASHQRTHTGEKPYK<br>CPECGKSFSTSGNLTEHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQAGHLA<br>SHQRTHTGKKTSASGSGGGSGGARDDAKSLTAWSRTLVTFKD<br>VFVDFTREEWKLLDTAQQILYRNVMLENYKNLVSLGYQLTKP<br>DVILRLEKGEEPWLVEREIHQETHPDSETAFEIKSSVPSSGGKRP<br>AATKKAGQAKKKKGS |

В некоторых вариантах осуществления репрессор экспрессии содержит нацеливающуюся функциональную группу, содержащую домен по типу "Zn-пальца" (например, кодируемый нуклеотидной последовательностью под любым из SEQ ID NO:

44-49 или 115), и эффекторную функциональную группу, содержащую MQ1, например бактериальный MQ1 (например, кодируемый нуклеотидной последовательностью под SEQ ID NO: 52). В некоторых вариантах осуществления репрессоры экспрессии кодируются последовательностью нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 61, 62, 63, 64, 65, 66, 116, 117, 118 или 130. Последовательности нуклеиновой кислоты данных иллюстративных репрессоров экспрессии раскрыты в таблице 8. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота, описанная в данном документе, содержит последовательность нуклеиновой кислоты под любым из SEQ ID NO: 61-66, 116-118, 130 или последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 99 или 100% идентичностью с ней или имеет не более чем 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 положение, отличающееся от нее. В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты содержит поли-А-последовательность, а в других вариантах осуществления, нуклеиновая кислота не содержит поли-А-последовательность. Например, в некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота, описанная в данном документе, содержит последовательность в соответствии с любым из SEQ ID NO: 61-66, 116-118 или 130 (или последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 99 или 100% идентичностью с ней или имеет не более чем 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 положение, отличающееся от нее), но с отсутствующей 3'-поли-А-последовательностью или присутствующей 3'-поли-А-последовательностью более короткой длины.

Таблица 8. Нуклеотидные последовательности иллюстративных эффекторов ZF-MQ1

| Название | SEQ ID NO: | ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ |
|---|---|---|
| ZF7-MQ1 (нт) | 61 | AGGAAATAAGAGAGAAAAGAAGAGTAAGAAGAAATAT<br>AAGAGCCACCATGGCCCCCAAGAAGAAGCGGAAGGTGG<br>GCATCCACGGCGTGCCCGCCGCCGGCAGCAGCGGATCCC<br>TGGAGCCCGGAGAGAAGCCCTACAAATGCCCCGAGTGT<br>GGAAAGAGCTTCTCTAGAAATGACGCTCTGACAGAACA<br>CCAGAGGACCCATACCGGCGAGAAACCTTACAAATGCC<br>CCGAGTGCGGAAAAAGCTTTAGCGATTGCAGAGATCTG<br>GCTAGACATCAGAGAACACACACCGGCGAGAAGCCCTA<br>TAAGTGCCCCGAATGCGGCAAGAGCTTTAGCGACCCCGG<br>CCATCTGGTGAGACATCAAAGGACACATACCGGAGAAA<br>AACCTTACAAGTGCCCCGAGTGCGGAAAGTCCTTCTCCC<br>AGAGCGGCCATCTCACCGAGCATCAAAGGACCCACACC<br>GGCGAAAAGCCTTATAAATGTCCCGAATGTGGCAAGTCC |

| | | |
|---|---|---|
| | | TTCTCTAGAGAGGATAATCTGCACACCCATCAGAGGACC<br>CACACCGGCGAAAAGCCTTATAAATGCCCCGAATGTGG<br>AAAGTCCTTTTCCACCAAGAACTCTCTGACCGAGCATCA<br>GAGGACACACACCGGAGAGAAACCCTATAAATGTCCCG<br>AGTGTGGCAAGAGCTTCAGCAGAGCCGACAATCTGACA<br>GAGCACCAAAGAACACATACCGGCGAAAAGCCCACCGG<br>CAAAAAGACCAGCGCTAGCGGCAGCGGCGGCGGCAGCG<br>GCGGCGCCCGGGACAGCAAGGTGGAGAACAAGACCAAG<br>AAGCTGCGGGTGTTCGAGGCCTTCGCCGGCATCGGCGCC<br>CAGCGGAAGGCCCTGGAGAAGGTGCGGAAGGACGAGTA<br>CGAGATCGTGGGCCTGGCCGAGTGGTACGTGCCCGCCAT<br>CGTGATGTACCAGGCCATCCACAACAACTTCCACACCAA<br>GCTGGAGTACAAGAGCGTGAGCCGGGAGGAGATGATCG<br>ACTACCTGGAGAACAAGACCCTGAGCTGGAACAGCAAG<br>AACCCCGTGAGCAACGGCTACTGGAAGCGGAAGAAGGA<br>CGACGAGCTGAAGATCATCTACAACGCCATCAAGCTGA<br>GCGAGAAGGAGGGCAACATCTTCGACATCCGGGACCTG<br>TACAAGCGGACCCTGAAGAACATCGACCTGCTGACCTAC<br>AGCTTCCCCTGCCAGGACCTGAGCCAGCAGGGCATCCAG<br>AAGGGCATGAAGCGGGGCAGCGGCACCCGGAGCGGCCT<br>GCTGTGGGAGATCGAGCGGGCCCTGGACAGCACCGAGA<br>AGAACGACCTGCCCAAGTACCTGCTGATGGAGAACGTG<br>GGCGCCCTGCTGCACAAGAAGAACGAGGAGGAGCTGAA<br>CCAGTGGAAGCAGAAGCTGGAGAGCCTGGGCTACCAGA<br>ACAGCATCGAGGTGCTGAACGCCGCCGACTTCGGCAGC<br>AGCCAGGCCCGGCGGCGGGTGTTCATGATCAGCACCCTG<br>AACGAGTTCGTGGAGCTGCCCAAGGGCGACAAGAAGCC<br>CAAGAGCATCAAGAAGGTGCTGAACAAGATCGTGAGCG<br>AGAAGGACATCCTGAACAACCTGCTGAAGTACAACCTG<br>ACCGAGTTCAAGAAAACCAAGAGCAACATCAACAAGGC<br>CAGCCTGATCGGCTACAGCAAGTTCAACAGCGAGGGCT<br>ACGTGTACGACCCCGAGTTCACCGGCCCCACCCTGACCG<br>CCAGCGGCGCCAACAGCCGGATCAAGATCAAGGACGGC<br>AGCAACATCCGGAAGATGAACAGCGACGAGACCTTCCT<br>GTACATCGGCTTCGACAGCCAGGACGGCAAGCGGGTGA |

| | | |
|---|---|---|
| | | ACGAGATCGAGTTCCTGACCGAGAACCAGAAGATCTTCG<br>TGTGCGGCAACAGCATCAGCGTGGAGGTGCTGGAGGCC<br>ATCATCGACAAGATCGGCGGCCCCAGCAGCGGCGGCAA<br>GCGGCCCGCCGCCACCAAGAAGGCCGGCCAGGCCAAGA<br>AGAAGAAGGGCAGCTACCCCTACGACGTGCCCGACTAC<br>GCCTGAGCGGCCGCTTAATTAAGCTGCCTTCTGCGGGGC<br>TTGCCTTCTGGCCATGCCCTTCTTCTCTCCCTTGCACCTG<br>TACCTCTTGGTCTTTGAATAAAGCCTGAGTAGGAAGTCT<br>AGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA<br>AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA<br>AAAAAAAA |
| ZF8-MQ1<br>(нт) | 62 | AGGAAATAAGAGAGAAAAGAAGAGTAAGAAGAAATAT<br>AAGAGCCACCATGGCCCCCAAGAAGAAGCGGAAGGTGG<br>GCATCCACGGCGTGCCCGCCGCCGGCAGCAGCGGATCCC<br>TGGAGCCCGGCGAGAAACCCTACAAGTGCCCCGAGTGT<br>GGCAAATCCTTCTCTAGATCCGACAAACTGACCGAACAT<br>CAGAGGACCCATACCGGCGAAAAACCTTATAAATGTCCC<br>GAGTGCGGAAAGTCCTTCTCTAGAAGGGACGAGCTGAA<br>CGTGCATCAGAGAACACATACCGGCGAGAAGCCCTATA<br>AATGCCCCGAATGCGGCAAAAGCTTCTCTAGAAGCGATC<br>ATCTGACCAACCACCAGAGAACCCATACCGGAGAAAAG<br>CCTTACAAGTGTCCCGAATGTGGAAAATCCTTCAGCTCC<br>CCCGCCGATCTGACCAGACACCAAAGGACCCACACCGG<br>CGAGAAGCCCTATAAATGCCCCGAGTGCGGCAAGAGCT<br>TTTCCAGATCCGACCATCTGACCAATCATCAAAGAACCC<br>ACACCGGCGAAAAGCCTTATAAATGTCCCGAGTGCGGC<br>AAATCCTTTTCCAGCAAGAAGGCTCTGACCGAGCATCAA<br>AGGACCCATACCGGCGAGAAGCCTTACAAATGCCCCGA<br>GTGTGGAAAGTCCTTTAGCACCCATCTGGATCTGATTAG<br>ACACCAGAGGACACACACCGGAGAGAAACCCACCGGCA<br>AAAAGACCAGCGCTAGCGGCAGCGGCGGCGGCAGCGGC<br>GGCGCCCGGGACAGCAAGGTGGAGAACAAGACCAAGAA<br>GCTGCGGGTGTTCGAGGCCTTCGCCGGCATCGGCGCCCA<br>GCGGAAGGCCCTGGAGAAGGTGCGGAAGGACGAGTACG<br>AGATCGTGGGCCTGGCCGAGTGGTACGTGCCCGCCATCG |

| | | |
|---|---|---|
| | | TGATGTACCAGGCCATCCACAACAACTTCCACACCAAGC<br>TGGAGTACAAGAGCGTGAGCCGGGAGGAGATGATCGAC<br>TACCTGGAGAACAAGACCCTGAGCTGGAACAGCAAGAA<br>CCCCGTGAGCAACGGCTACTGGAAGCGGAAGAAGGACG<br>ACGAGCTGAAGATCATCTACAACGCCATCAAGCTGAGC<br>GAGAAGGAGGGCAACATCTTCGACATCCGGGACCTGTA<br>CAAGCGGACCCTGAAGAACATCGACCTGCTGACCTACA<br>GCTTCCCCTGCCAGGACCTGAGCCAGCAGGGCATCCAGA<br>AGGGCATGAAGCGGGGCAGCGGCACCCGGAGCGGCCTG<br>CTGTGGGAGATCGAGCGGGCCCTGGACAGCACCGAGAA<br>GAACGACCTGCCCAAGTACCTGCTGATGGAGAACGTGG<br>GCGCCCTGCTGCACAAGAAGAACGAGGAGGAGCTGAAC<br>CAGTGGAAGCAGAAGCTGGAGAGCCTGGGCTACCAGAA<br>CAGCATCGAGGTGCTGAACGCCGCCGACTTCGGCAGCA<br>GCCAGGCCCGGCGGCGGGTGTTCATGATCAGCACCCTGA<br>ACGAGTTCGTGGAGCTGCCCAAGGGCGACAAGAAGCCC<br>AAGAGCATCAAGAAGGTGCTGAACAAGATCGTGAGCGA<br>GAAGGACATCCTGAACAACCTGCTGAAGTACAACCTGA<br>CCGAGTTCAAGAAAACCAAGAGCAACATCAACAAGGCC<br>AGCCTGATCGGCTACAGCAAGTTCAACAGCGAGGGCTA<br>CGTGTACGACCCCGAGTTCACCGGCCCCACCCTGACCGC<br>CAGCGGCGCCAACAGCCGGATCAAGATCAAGGACGGCA<br>GCAACATCCGGAAGATGAACAGCGACGAGACCTTCCTG<br>TACATCGGCTTCGACAGCCAGGACGGCAAGCGGGTGAA<br>CGAGATCGAGTTCCTGACCGAGAACCAGAAGATCTTCGT<br>GTGCGGCAACAGCATCAGCGTGGAGGTGCTGGAGGCCA<br>TCATCGACAAGATCGGCGGCCCCAGCAGCGGCGGCAAG<br>CGGCCCGCCGCCACCAAGAAGGCCGGCCAGGCCAAGAA<br>GAAGAAGGGCAGCTACCCCTACGACGTGCCCGACTACG<br>CCTGAGCGGCCGCTTAATTAAGCTGCCTTCTGCGGGGCT<br>TGCCTTCTGGCCATGCCCTTCTTCTCTCCCTTGCACCTGT<br>ACCTCTTGGTCTTTGAATAAAGCCTGAGTAGGAAGTCTA<br>GAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA<br>AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA<br>AAAAAAA |

| | | |
|---|---|---|
| ZF9-MQ1 (нт) | 63 | AGGAAATAAGAGAGAAAAGAAGAGTAAGAAGAAATAT<br>AAGAGCCACCATGGCCCCCAAGAAGAAGCGGAAGGTGG<br>GCATCCACGGCGTGCCCGCCGCCGGCAGCAGCGGATCCC<br>TGGAGCCCGGCGAGAAACCTTACAAATGCCCCGAGTGC<br>GGCAAGAGCTTCAGCAGAAGCGACGATCTGGTGAGGCA<br>CCAAAGAACCCACACCGGCGAAAAACCTTACAAGTGTC<br>CCGAATGCGGAAAGTCCTTCAGCAGAGAGGACAATCTG<br>CACACCCACCAGAGAACACACACCGGAGAAAAGCCTTA<br>CAAGTGCCCCGAATGCGGCAAATCCTTTTCTAGAAGCGA<br>TCATCTGACCACCCACCAAAGAACACATACCGGCGAGA<br>AGCCTTACAAATGTCCCGAGTGCGGAAAGTCCTTCTCCC<br>AGAGAGCCAATCTGAGGGCTCATCAAAGGACCCATACC<br>GGCGAAAAGCCCTACAAATGCCCCGAGTGCGGAAAATC<br>CTTCAGCCAGCTGGCCCATCTGAGAGCCCACCAAAGGAC<br>ACACACCGGAGAGAAACCCTATAAGTGCCCCGAGTGTG<br>GAAAAAGCTTTTCCCAGAGGGCCAATCTGAGGGCCCATC<br>AGAGGACCCATACCGGAGAGAAGCCTTATAAATGTCCC<br>GAGTGCGGAAAAAGCTTCAGCGAGAGGAGCCATCTGAG<br>GGAACATCAAAGAACCCACACCGGCGAAAAACCCACCG<br>GAAAAAAGACCAGCGCTAGCGGCAGCGGCGGCGGCAGC<br>GGCGGCGCCCGGGACAGCAAGGTGGAGAACAAGACCAA<br>GAAGCTGCGGGTGTTCGAGGCCTTCGCCGGCATCGGCGC<br>CCAGCGGAAGGCCCTGGAGAAGGTGCGGAAGGACGAGT<br>ACGAGATCGTGGGCCTGGCCGAGTGGTACGTGCCCGCCA<br>TCGTGATGTACCAGGCCATCCACAACAACTTCCACACCA<br>AGCTGGAGTACAAGAGCGTGAGCCGGGAGGAGATGATC<br>GACTACCTGGAGAACAAGACCCTGAGCTGGAACAGCAA<br>GAACCCCGTGAGCAACGGCTACTGGAAGCGGAAGAAGG<br>ACGACGAGCTGAAGATCATCTACAACGCCATCAAGCTG<br>AGCGAGAAGGAGGGCAACATCTTCGACATCCGGGACCT<br>GTACAAGCGGACCCTGAAGAACATCGACCTGCTGACCTA<br>CAGCTTCCCCTGCCAGGACCTGAGCCAGCAGGGCATCCA<br>GAAGGGCATGAAGCGGGGCAGCGGCACCCGGAGCGGCC<br>TGCTGTGGGAGATCGAGCGGGCCCTGGACAGCACCGAG<br>AAGAACGACCTGCCCAAGTACCTGCTGATGGAGAACGT |

| | | |
|---|---|---|
| | | GGGCGCCCTGCTGCACAAGAAGAACGAGGAGGAGCTGA<br>ACCAGTGGAAGCAGAAGCTGGAGAGCCTGGGCTACCAG<br>AACAGCATCGAGGTGCTGAACGCCGCCGACTTCGGCAG<br>CAGCCAGGCCCGGCGGCGGGTGTTCATGATCAGCACCCT<br>GAACGAGTTCGTGGAGCTGCCCAAGGGCGACAAGAAGC<br>CCAAGAGCATCAAGAAGGTGCTGAACAAGATCGTGAGC<br>GAGAAGGACATCCTGAACAACCTGCTGAAGTACAACCT<br>GACCGAGTTCAAGAAAACCAAGAGCAACATCAACAAGG<br>CCAGCCTGATCGGCTACAGCAAGTTCAACAGCGAGGGCT<br>ACGTGTACGACCCCGAGTTCACCGGCCCCACCCTGACCG<br>CCAGCGGCGCCAACAGCCGGATCAAGATCAAGGACGGC<br>AGCAACATCCGGAAGATGAACAGCGACGAGACCTTCCT<br>GTACATCGGCTTCGACAGCCAGGACGGCAAGCGGGTGA<br>ACGAGATCGAGTTCCTGACCGAGAACCAGAAGATCTTCG<br>TGTGCGGCAACAGCATCAGCGTGGAGGTGCTGGAGGCC<br>ATCATCGACAAGATCGGCGGCCCCAGCAGCGGCGGCAA<br>GCGGCCCGCCGCCACCAAGAAGGCCGGCCAGGCCAAGA<br>AGAAGAAGGGCAGCTACCCCTACGACGTGCCCGACTAC<br>GCCTGAGCGGCCGCTTAATTAAGCTGCCTTCTGCGGGGC<br>TTGCCTTCTGGCCATGCCCTTCTTCTCTCCCTTGCACCTG<br>TACCTCTTGGTCTTTGAATAAAGCCTGAGTAGGAAGTCT<br>AGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA<br>AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA<br>AAAAAAAA |
| ZF10-MQ1<br>(нт) | 64 | AGTGTGGAAAAAGCTTTAGCCAAAGCGGCGATCTGAGG<br>AGACACCAAAGAACACACACCGGCGAGAAGCCCTACAA<br>ATGTCCCGAGTGCGGAAAGAGCTTCAGCCAGAGCGGCC<br>ATCTGACCGAGCATCAGAGAACCCATACCGGCGAAAAA<br>CCTTATAAGTGCCCCGAGTGTGGAAAGTCCTTCTCCGAG<br>AGATCCCATCTGAGAGAACACCAGAGGACACACACCGG<br>CGAAAAACCTTATAAGTGTCCCGAGTGCGGAAAGTCCTT<br>CAGCGATCCCGGCCATCTGGTGAGACATCAAAGGACAC<br>ATACCGGCGAAAAACCTTATAAGTGTCCCGAATGCGGCA<br>AGAGCTTTAGCAGAAACGACACACTCACCGAACACCAG<br>AGGACCCACACCGGCGAGAAACCCTACAAATGCCCCGA |

| | | |
|---|---|---|
| | | GTGCGGCAAATCCTTTTCTAGAGCCGACAATCTGACCGA<br>ACACCAGAGGACCCATACCGGAGAAAAGCCTTACAAAT<br>GTCCCGAGTGTGGCAAATCCTTCTCCACCCATCTGGATC<br>TGATTAGACACCAAAGAACACATACCGGAGAAAAGCCC<br>ACCGGAAAAAAGACCAGCGCTAGCGGCAGCGGCGGCGG<br>CAGCGGCGGCGCCCGGGACAGCAAGGTGGAGAACAAGA<br>CCAAGAAGCTGCGGGTGTTCGAGGCCTTCGCCGGCATCG<br>GCGCCCAGCGGAAGGCCCTGGAGAAGGTGCGGAAGGAC<br>GAGTACGAGATCGTGGGCCTGGCCGAGTGGTACGTGCCC<br>GCCATCGTGATGTACCAGGCCATCCACAACAACTTCCAC<br>ACCAAGCTGGAGTACAAGAGCGTGAGCCGGGAGGAGAT<br>GATCGACTACCTGGAGAACAAGACCCTGAGCTGGAACA<br>GCAAGAACCCCGTGAGCAACGGCTACTGGAAGCGGAAG<br>AAGGACGACGAGCTGAAGATCATCTACAACGCCATCAA<br>GCTGAGCGAGAAGGAGGGCAACATCTTCGACATCCGGG<br>ACCTGTACAAGCGGACCCTGAAGAACATCGACCTGCTGA<br>CCTACAGCTTCCCCTGCCAGGACCTGAGCCAGCAGGGCA<br>TCCAGAAGGGCATGAAGCGGGGCAGCGGCACCCGGAGC<br>GGCCTGCTGTGGGAGATCGAGCGGGCCCTGGACAGCAC<br>CGAGAAGAACGACCTGCCCAAGTACCTGCTGATGGAGA<br>ACGTGGGCGCCCTGCTGCACAAGAAGAACGAGGAGGAG<br>CTGAACCAGTGGAAGCAGAAGCTGGAGAGCCTGGGCTA<br>CCAGAACAGCATCGAGGTGCTGAACGCCGCCGACTTCG<br>GCAGCAGCCAGGCCCGGCGGCGGGTGTTCATGATCAGC<br>ACCCTGAACGAGTTCGTGGAGCTGCCCAAGGGCGACAA<br>GAAGCCCAAGAGCATCAAGAAGGTGCTGAACAAGATCG<br>TGAGCGAGAAGGACATCCTGAACAACCTGCTGAAGTAC<br>AACCTGACCGAGTTCAAGAAAACCAAGAGCAACATCAA<br>CAAGGCCAGCCTGATCGGCTACAGCAAGTTCAACAGCG<br>AGGGCTACGTGTACGACCCCGAGTTCACCGGCCCCACCC<br>TGACCGCCAGCGGCGCCAACAGCCGGATCAAGATCAAG<br>GACGGCAGCAACATCCGGAAGATGAACAGCGACGAGAC<br>CTTCCTGTACATCGGCTTCGACAGCCAGGACGGCAAGCG<br>GGTGAACGAGATCGAGTTCCTGACCGAGAACCAGAAGA<br>TCTTCGTGTGCGGCAACAGCATCAGCGTGGAGGTGCTGG |

| | | |
|---|---|---|
| | | AGGCCATCATCGACAAGATCGGCGGCCCCAGCAGCGGC<br>GGCAAGCGGCCCGCCGCCACCAAGAAGGCCGGCCAGGC<br>CAAGAAGAAGAAGGGCAGCTACCCCTACGACGTGCCCG<br>ACTACGCCTGAGCGGCCGCTTAATTAAGCTGCCTTCTGC<br>GGGGCTTGCCTTCTGGCCATGCCCTTCTTCTCTCCCTTGC<br>ACCTGTACCTCTTGGTCTTTGAATAAAGCCTGAGTAGGA<br>AGTCTAGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA<br>AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA<br>AAAAAAAAAAAA |
| ZF11-MQ1<br>(нт) | 65 | GCCTTATAAGTGCCCCGAGTGTGGCAAATCCTTTTCCGA<br>CTGTAGAGATCTGGCCAGACATCAAAGAACCCACACCG<br>GAGAGAAACCTTATAAATGCCCCGAGTGCGGCAAGTCCT<br>TTAGCCATACCGGCCATCTGCTGGAGCACCAGAGGACCC<br>ATACCGGCGAGAAGCCTTACAAATGCCCCGAGTGCGGC<br>AAAAGCTTCAGCAGAAATGACGCTCTGACCGAGCATCA<br>AAGGACCCATACCGGCGAAAAGCCCTACAAGTGTCCCG<br>AGTGTGGAAAGTCCTTCTCCCAGAGCGGCGATCTGAGGA<br>GACACCAGAGAACACACACCGGCGAGAAACCCTATAAA<br>TGTCCCGAGTGCGGAAAGAGCTTTAGCGACAGCGGCAA<br>TCTGAGGGTGCATCAAAGAACACACACCGGCGAAAAAC<br>CCACCGGAAAAAAGACAAGCGCTAGCGGCAGCGGCGGC<br>GGCAGCGGCGGCGCCCGGGACAGCAAGGTGGAGAACAA<br>GACCAAGAAGCTGCGGGTGTTCGAGGCCTTCGCCGGCAT<br>CGGCGCCCAGCGGAAGGCCCTGGAGAAGGTGCGGAAGG<br>ACGAGTACGAGATCGTGGGCCTGGCCGAGTGGTACGTG<br>CCCGCCATCGTGATGTACCAGGCCATCCACAACAACTTC<br>CACACCAAGCTGGAGTACAAGAGCGTGAGCCGGGAGGA<br>GATGATCGACTACCTGGAGAACAAGACCCTGAGCTGGA<br>ACAGCAAGAACCCCGTGAGCAACGGCTACTGGAAGCGG<br>AAGAAGGACGACGAGCTGAAGATCATCTACAACGCCAT<br>CAAGCTGAGCGAGAAGGAGGGCAACATCTTCGACATCC<br>GGGACCTGTACAAGCGGACCCTGAAGAACATCGACCTG<br>CTGACCTACAGCTTCCCCTGCCAGGACCTGAGCCAGCAG<br>GGCATCCAGAAGGGCATGAAGCGGGGCAGCGGCACCCG<br>GAGCGGCCTGCTGTGGGAGATCGAGCGGGCCCTGGACA |

| | | |
|---|---|---|
| | | GCACCGAGAAGAACGACCTGCCCAAGTACCTGCTGATG<br>GAGAACGTGGGCGCCCTGCTGCACAAGAAGAACGAGGA<br>GGAGCTGAACCAGTGGAAGCAGAAGCTGGAGAGCCTGG<br>GCTACCAGAACAGCATCGAGGTGCTGAACGCCGCCGAC<br>TTCGGCAGCAGCCAGGCCCGGCGGCGGGTGTTCATGATC<br>AGCACCCTGAACGAGTTCGTGGAGCTGCCCAAGGGCGA<br>CAAGAAGCCCAAGAGCATCAAGAAGGTGCTGAACAAGA<br>TCGTGAGCGAGAAGGACATCCTGAACAACCTGCTGAAG<br>TACAACCTGACCGAGTTCAAGAAAACCAAGAGCAACAT<br>CAACAAGGCCAGCCTGATCGGCTACAGCAAGTTCAACA<br>GCGAGGGCTACGTGTACGACCCCGAGTTCACCGGCCCCA<br>CCCTGACCGCCAGCGGCGCCAACAGCCGGATCAAGATC<br>AAGGACGGCAGCAACATCCGGAAGATGAACAGCGACGA<br>GACCTTCCTGTACATCGGCTTCGACAGCCAGGACGGCAA<br>GCGGGTGAACGAGATCGAGTTCCTGACCGAGAACCAGA<br>AGATCTTCGTGTGCGGCAACAGCATCAGCGTGGAGGTGC<br>TGGAGGCCATCATCGACAAGATCGGCGGCCCCAGCAGC<br>GGCGGCAAGCGGCCCGCCGCCACCAAGAAGGCCGGCCA<br>GGCCAAGAAGAAGAAGGGCAGCTACCCCTACGACGTGC<br>CCGACTACGCCTGAGCGGCCGCTTAATTAAGCTGCCTTC<br>TGCGGGGCTTGCCTTCTGGCCATGCCCTTCTTCTCTCCCT<br>TGCACCTGTACCTCTTGGTCTTTGAATAAAGCCTGAGTA<br>GGAAGTCTAGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA<br>AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA<br>AAAAAAAAAAAAAAAA |
| ZF12-MQ1<br>(нт) | 66 | GACCCATACCGGCGAAAAGCCTTACAAGTGTCCCGAGTG<br>CGGAAAGTCCTTCTCTAGATCCGACAACCTCGTGAGGCA<br>CCAGAGAACCCACACCGGCGAGAAACCTTACAAATGTC<br>CCGAGTGTGGCAAAAGCTTTTCTAGAAGCGACGAGCTGG<br>TGAGACATCAAAGAACCCATACCGGCGAAAAACCTTAT<br>AAGTGTCCCGAGTGCGGCAAATCCTTTAGCCAGCTGGCC<br>CATCTGAGGGCCCACCAGAGAACACATACCGGCGAAAA<br>ACCCACCGGCAAAAAGACAAGCGCTAGCGGCAGCGGCG<br>GCGGCAGCGGCGGCGCCCGGGACAGCAAGGTGGAGAAC<br>AAGACCAAGAAGCTGCGGGTGTTCGAGGCCTTCGCCGG |

| | | |
|---|---|---|
| | | CATCGGCGCCCAGCGGAAGGCCCTGGAGAAGGTGCGGA<br>AGGACGAGTACGAGATCGTGGGCCTGGCCGAGTGGTAC<br>GTGCCCGCCATCGTGATGTACCAGGCCATCCACAACAAC<br>TTCCACACCAAGCTGGAGTACAAGAGCGTGAGCCGGGA<br>GGAGATGATCGACTACCTGGAGAACAAGACCCTGAGCT<br>GGAACAGCAAGAACCCCGTGAGCAACGGCTACTGGAAG<br>CGGAAGAAGGACGACGAGCTGAAGATCATCTACAACGC<br>CATCAAGCTGAGCGAGAAGGAGGGCAACATCTTCGACA<br>TCCGGGACCTGTACAAGCGGACCCTGAAGAACATCGAC<br>CTGCTGACCTACAGCTTCCCCTGCCAGGACCTGAGCCAG<br>CAGGGCATCCAGAAGGGCATGAAGCGGGGCAGCGGCAC<br>CCGGAGCGGCCTGCTGTGGGAGATCGAGCGGGCCCTGG<br>ACAGCACCGAGAAGAACGACCTGCCCAAGTACCTGCTG<br>ATGGAGAACGTGGGCGCCCTGCTGCACAAGAAGAACGA<br>GGAGGAGCTGAACCAGTGGAAGCAGAAGCTGGAGAGCC<br>TGGGCTACCAGAACAGCATCGAGGTGCTGAACGCCGCC<br>GACTTCGGCAGCAGCCAGGCCCGGCGGCGGGTGTTCATG<br>ATCAGCACCCTGAACGAGTTCGTGGAGCTGCCCAAGGGC<br>GACAAGAAGCCCAAGAGCATCAAGAAGGTGCTGAACAA<br>GATCGTGAGCGAGAAGGACATCCTGAACAACCTGCTGA<br>AGTACAACCTGACCGAGTTCAAGAAAACCAAGAGCAAC<br>ATCAACAAGGCCAGCCTGATCGGCTACAGCAAGTTCAAC<br>AGCGAGGGCTACGTGTACGACCCCGAGTTCACCGGCCCC<br>ACCCTGACCGCCAGCGGCGCCAACAGCCGGATCAAGAT<br>CAAGGACGGCAGCAACATCCGGAAGATGAACAGCGACG<br>AGACCTTCCTGTACATCGGCTTCGACAGCCAGGACGGCA<br>AGCGGGTGAACGAGATCGAGTTCCTGACCGAGAACCAG<br>AAGATCTTCGTGTGCGGCAACAGCATCAGCGTGGAGGTG<br>CTGGAGGCCATCATCGACAAGATCGGCGGCCCCAGCAG<br>CGGCGGCAAGCGGCCCGCCGCCACCAAGAAGGCCGGCC<br>AGGCCAAGAAGAAGAAGGGCAGCTACCCCTACGACGTG<br>CCCGACTACGCCTGAGCGGCCGCTTAATTAAGCTGCCTT<br>CTGCGGGGCTTGCCTTCTGGCCATGCCCTTCTTCTCTCCC<br>TTGCACCTGTACCTCTTGGTCTTTGAATAAAGCCTGAGTA<br>GGAAGTCTAGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA |

| | | |
|---|---|---|
| | | AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA<br>AAAAAAAAAAAAAAA |
| ZF10-MQ1<br>(нт)<br>полной<br>длины | 116 | AGGAAATAAGAGAGAAAAGAAGAGTAAGAAGAAATAT<br>AAGAGCCACCATGGCCCCCAAGAAGAAGCGGAAGGTGG<br>GCATCCACGGCGTGCCCGCCGCCGGCAGCAGCGGATCCC<br>TGGAGCCCGGCGAGAAACCCTACAAGTGCCCCGAGTGT<br>GGAAAAAGCTTTAGCCAAAGCGGCGATCTGAGGAGACA<br>CCAAAGAACACACACCGGCGAGAAGCCCTACAAATGTC<br>CCGAGTGCGGAAAGAGCTTCAGCCAGAGCGGCCATCTG<br>ACCGAGCATCAGAGAACCCATACCGGCGAAAAACCTTA<br>TAAGTGCCCCGAGTGTGGAAAGTCCTTCTCCGAGAGATC<br>CCATCTGAGAGAACACCAGAGGACACACACCGGCGAAA<br>AACCTTATAAGTGTCCCGAGTGCGGAAAGTCCTTCAGCG<br>ATCCCGGCCATCTGGTGAGACATCAAAGGACACATACCG<br>GCGAAAAACCTTATAAGTGTCCCGAATGCGGCAAGAGC<br>TTTAGCAGAAACGACACACTCACCGAACACCAGAGGAC<br>CCACACCGGCGAGAAACCCTACAAATGCCCCGAGTGCG<br>GCAAATCCTTTTCTAGAGCCGACAATCTGACCGAACACC<br>AGAGGACCCATACCGGAGAAAAGCCTTACAAATGTCCC<br>GAGTGTGGCAAATCCTTCTCCACCCATCTGGATCTGATT<br>AGACACCAAAGAACACATACCGGAGAAAAGCCCACCGG<br>AAAAAAGACCAGCGCTAGCGGCAGCGGCGGCGGCAGCG<br>GCGGCGCCCGGGACAGCAAGGTGGAGAACAAGACCAAG<br>AAGCTGCGGGTGTTCGAGGCCTTCGCCGGCATCGGCGCC<br>CAGCGGAAGGCCCTGGAGAAGGTGCGGAAGGACGAGTA<br>CGAGATCGTGGGCCTGGCCGAGTGGTACGTGCCCGCCAT<br>CGTGATGTACCAGGCCATCCACAACAACTTCCACACCAA<br>GCTGGAGTACAAGAGCGTGAGCCGGGAGGAGATGATCG<br>ACTACCTGGAGAACAAGACCCTGAGCTGGAACAGCAAG<br>AACCCCGTGAGCAACGGCTACTGGAAGCGGAAGAAGGA<br>CGACGAGCTGAAGATCATCTACAACGCCATCAAGCTGA<br>GCGAGAAGGAGGGCAACATCTTCGACATCCGGGACCTG<br>TACAAGCGGACCCTGAAGAACATCGACCTGCTGACCTAC<br>AGCTTCCCCTGCCAGGACCTGAGCCAGCAGGGCATCCAG<br>AAGGGCATGAAGCGGGGCAGCGGCACCCGGAGCGGCCT |

| | | |
|---|---|---|
| | | GCTGTGGGAGATCGAGCGGGCCCTGGACAGCACCGAGA<br>AGAACGACCTGCCCAAGTACCTGCTGATGGAGAACGTG<br>GGCGCCCTGCTGCACAAGAAGAACGAGGAGGAGCTGAA<br>CCAGTGGAAGCAGAAGCTGGAGAGCCTGGGCTACCAGA<br>ACAGCATCGAGGTGCTGAACGCCGCCGACTTCGGCAGC<br>AGCCAGGCCCGGCGGCGGGTGTTCATGATCAGCACCCTG<br>AACGAGTTCGTGGAGCTGCCCAAGGGCGACAAGAAGCC<br>CAAGAGCATCAAGAAGGTGCTGAACAAGATCGTGAGCG<br>AGAAGGACATCCTGAACAACCTGCTGAAGTACAACCTG<br>ACCGAGTTCAAGAAAACCAAGAGCAACATCAACAAGGC<br>CAGCCTGATCGGCTACAGCAAGTTCAACAGCGAGGGCT<br>ACGTGTACGACCCCGAGTTCACCGGCCCCACCCTGACCG<br>CCAGCGGCGCCAACAGCCGGATCAAGATCAAGGACGGC<br>AGCAACATCCGGAAGATGAACAGCGACGAGACCTTCCT<br>GTACATCGGCTTCGACAGCCAGGACGGCAAGCGGGTGA<br>ACGAGATCGAGTTCCTGACCGAGAACCAGAAGATCTTCG<br>TGTGCGGCAACAGCATCAGCGTGGAGGTGCTGGAGGCC<br>ATCATCGACAAGATCGGCGGCCCCAGCAGCGGCGGCAA<br>GCGGCCCGCCGCCACCAAGAAGGCCGGCCAGGCCAAGA<br>AGAAGAAGGGCAGCTACCCCTACGACGTGCCCGACTAC<br>GCCTGAGCGGCCGCTTAATTAAGCTGCCTTCTGCGGGGC<br>TTGCCTTCTGGCCATGCCCTTCTTCTCTCCCTTGCACCTG<br>TACCTCTTGGTCTTTGAATAAAGCCTGAGTAGGAAGTCT<br>AGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA<br>AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA<br>AAAAAAAA |
| ZF11-MQ1<br>(нт)<br>полной<br>длины | 117 | AGGAAATAAGAGAGAAAAGAAGAGTAAGAAGAAATAT<br>AAGAGCCACCATGGCCCCCAAGAAGAAGCGGAAGGTGG<br>GCATCCACGGCGTGCCCGCCGCCGGCAGCAGCGGATCCC<br>TGGAGCCCGGCGAAAAACCCTATAAGTGCCCCGAATGT<br>GGAAAGAGCTTCAGCCATACCGGCCATCTGCTGGAACAC<br>CAAAGGACACACACCGGCGAGAAACCTTACAAGTGTCC<br>CGAGTGCGGAAAAAGCTTCTCCTCCAAAAAGGCTCTCAC<br>CGAGCACCAGAGAACACATACCGGCGAAAAGCCTTATA<br>AGTGCCCCGAGTGTGGCAAATCCTTTTCCGACTGTAGAG |

| | | |
|---|---|---|
| | | ATCTGGCCAGACATCAAAGAACCCACACCGGAGAGAAA<br>CCTTATAAATGCCCCGAGTGCGGCAAGTCCTTTAGCCAT<br>ACCGGCCATCTGCTGGAGCACCAGAGGACCCATACCGG<br>CGAGAAGCCTTACAAATGCCCCGAGTGCGGCAAAAGCT<br>TCAGCAGAAATGACGCTCTGACCGAGCATCAAAGGACC<br>CATACCGGCGAAAAGCCCTACAAGTGTCCCGAGTGTGG<br>AAAGTCCTTCTCCCAGAGCGGCGATCTGAGGAGACACCA<br>GAGAACACACACCGGCGAGAAACCCTATAAATGTCCCG<br>AGTGCGGAAAGAGCTTTAGCGACAGCGGCAATCTGAGG<br>GTGCATCAAAGAACACACACCGGCGAAAAACCCACCGG<br>AAAAAAGACAAGCGCTAGCGGCAGCGGCGGCGGCAGCG<br>GCGGCGCCCGGGACAGCAAGGTGGAGAACAAGACCAAG<br>AAGCTGCGGGTGTTCGAGGCCTTCGCCGGCATCGGCGCC<br>CAGCGGAAGGCCCTGGAGAAGGTGCGGAAGGACGAGTA<br>CGAGATCGTGGGCCTGGCCGAGTGGTACGTGCCCGCCAT<br>CGTGATGTACCAGGCCATCCACAACAACTTCCACACCAA<br>GCTGGAGTACAAGAGCGTGAGCCGGGAGGAGATGATCG<br>ACTACCTGGAGAACAAGACCCTGAGCTGGAACAGCAAG<br>AACCCCGTGAGCAACGGCTACTGGAAGCGGAAGAAGGA<br>CGACGAGCTGAAGATCATCTACAACGCCATCAAGCTGA<br>GCGAGAAGGAGGGCAACATCTTCGACATCCGGGACCTG<br>TACAAGCGGACCCTGAAGAACATCGACCTGCTGACCTAC<br>AGCTTCCCCTGCCAGGACCTGAGCCAGCAGGGCATCCAG<br>AAGGGCATGAAGCGGGGCAGCGGCACCCGGAGCGGCCT<br>GCTGTGGGAGATCGAGCGGGCCCTGGACAGCACCGAGA<br>AGAACGACCTGCCCAAGTACCTGCTGATGGAGAACGTG<br>GGCGCCCTGCTGCACAAGAAGAACGAGGAGGAGCTGAA<br>CCAGTGGAAGCAGAAGCTGGAGAGCCTGGGCTACCAGA<br>ACAGCATCGAGGTGCTGAACGCCGCCGACTTCGGCAGC<br>AGCCAGGCCCGGCGGCGGGTGTTCATGATCAGCACCCTG<br>AACGAGTTCGTGGAGCTGCCCAAGGGCGACAAGAAGCC<br>CAAGAGCATCAAGAAGGTGCTGAACAAGATCGTGAGCG<br>AGAAGGACATCCTGAACAACCTGCTGAAGTACAACCTG<br>ACCGAGTTCAAGAAAACCAAGAGCAACATCAACAAGGC<br>CAGCCTGATCGGCTACAGCAAGTTCAACAGCGAGGGCT |

| | | |
|---|---|---|
| | | ACGTGTACGACCCCGAGTTCACCGGCCCCACCCTGACCG<br>CCAGCGGCGCCAACAGCCGGATCAAGATCAAGGACGGC<br>AGCAACATCCGGAAGATGAACAGCGACGAGACCTTCCT<br>GTACATCGGCTTCGACAGCCAGGACGGCAAGCGGGTGA<br>ACGAGATCGAGTTCCTGACCGAGAACCAGAAGATCTTCG<br>TGTGCGGCAACAGCATCAGCGTGGAGGTGCTGGAGGCC<br>ATCATCGACAAGATCGGCGGCCCCAGCAGCGGCGGCAA<br>GCGGCCCGCCGCCACCAAGAAGGCCGGCCAGGCCAAGA<br>AGAAGAAGGGCAGCTACCCCTACGACGTGCCCGACTAC<br>GCCTGAGCGGCCGCTTAATTAAGCTGCCTTCTGCGGGGC<br>TTGCCTTCTGGCCATGCCCTTCTTCTCTCCCTTGCACCTG<br>TACCTCTTGGTCTTTGAATAAAGCCTGAGTAGGAAGTCT<br>AGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA<br>AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA<br>AAAAAAAA |
| ZF12- MQ1<br>(нт)<br>полной<br>длины | 118 | AGGAAATAAGAGAGAAAAGAAGAGTAAGAAGAAATAT<br>AAGAGCCACCATGGCCCCCAAGAAGAAGCGGAAGGTGG<br>GCATCCACGGCGTGCCCGCCGCCGGCAGCAGCGGATCCC<br>TGGAGCCCGGCGAGAAACCCTATAAATGCCCCGAATGC<br>GGAAAAAGCTTCAGCCAGTCCAGCTCTCTGGTGAGACAT<br>CAGAGGACACACACCGGCGAAAAGCCTTATAAGTGCCC<br>CGAGTGCGGCAAGTCCTTCTCTAGAAGCGATCACCTCAC<br>CAATCATCAGAGGACACATACCGGAGAGAAGCCCTATA<br>AGTGCCCCGAGTGCGGCAAGAGCTTTAGCCAGCTGGCTC<br>ATCTGAGAGCTCACCAAAGAACCCATACCGGCGAGAAG<br>CCTTACAAATGCCCCGAGTGTGGAAAATCCTTTTCCCAG<br>TCCAGCAACCTCGTCAGACATCAAAGGACCCATACCGGC<br>GAAAAGCCTTACAAGTGTCCCGAGTGCGGAAAGTCCTTC<br>TCTAGATCCGACAACCTCGTGAGGCACCAGAGAACCCAC<br>ACCGGCGAGAAACCTTACAAATGTCCCGAGTGTGGCAA<br>AAGCTTTTCTAGAAGCGACGAGCTGGTGAGACATCAAA<br>GAACCCATACCGGCGAAAAACCTTATAAGTGTCCCGAGT<br>GCGGCAAATCCTTTAGCCAGCTGGCCCATCTGAGGGCCC<br>ACCAGAGAACACATACCGGCGAAAAACCCACCGGCAAA<br>AAGACAAGCGCTAGCGGCAGCGGCGGCGGCAGCGGCGG |

| | | |
|---|---|---|
| | | CGCCCGGGACAGCAAGGTGGAGAACAAGACCAAGAAGC<br>TGCGGGTGTTCGAGGCCTTCGCCGGCATCGGCGCCCAGC<br>GGAAGGCCCTGGAGAAGGTGCGGAAGGACGAGTACGAG<br>ATCGTGGGCCTGGCCGAGTGGTACGTGCCCGCCATCGTG<br>ATGTACCAGGCCATCCACAACAACTTCCACACCAAGCTG<br>GAGTACAAGAGCGTGAGCCGGGAGGAGATGATCGACTA<br>CCTGGAGAACAAGACCCTGAGCTGGAACAGCAAGAACC<br>CCGTGAGCAACGGCTACTGGAAGCGGAAGAAGGACGAC<br>GAGCTGAAGATCATCTACAACGCCATCAAGCTGAGCGA<br>GAAGGAGGGCAACATCTTCGACATCCGGGACCTGTACA<br>AGCGGACCCTGAAGAACATCGACCTGCTGACCTACAGCT<br>TCCCCTGCCAGGACCTGAGCCAGCAGGGCATCCAGAAG<br>GGCATGAAGCGGGGCAGCGGCACCCGGAGCGGCCTGCT<br>GTGGGAGATCGAGCGGGCCCTGGACAGCACCGAGAAGA<br>ACGACCTGCCCAAGTACCTGCTGATGGAGAACGTGGGC<br>GCCCTGCTGCACAAGAAGAACGAGGAGGAGCTGAACCA<br>GTGGAAGCAGAAGCTGGAGAGCCTGGGCTACCAGAACA<br>GCATCGAGGTGCTGAACGCCGCCGACTTCGGCAGCAGCC<br>AGGCCCGGCGGCGGGTGTTCATGATCAGCACCCTGAACG<br>AGTTCGTGGAGCTGCCCAAGGGCGACAAGAAGCCCAAG<br>AGCATCAAGAAGGTGCTGAACAAGATCGTGAGCGAGAA<br>GGACATCCTGAACAACCTGCTGAAGTACAACCTGACCGA<br>GTTCAAGAAAACCAAGAGCAACATCAACAAGGCCAGCC<br>TGATCGGCTACAGCAAGTTCAACAGCGAGGGCTACGTGT<br>ACGACCCCGAGTTCACCGGCCCCACCCTGACCGCCAGCG<br>GCGCCAACAGCCGGATCAAGATCAAGGACGGCAGCAAC<br>ATCCGGAAGATGAACAGCGACGAGACCTTCCTGTACATC<br>GGCTTCGACAGCCAGGACGGCAAGCGGGTGAACGAGAT<br>CGAGTTCCTGACCGAGAACCAGAAGATCTTCGTGTGCGG<br>CAACAGCATCAGCGTGGAGGTGCTGGAGGCCATCATCG<br>ACAAGATCGGCGGCCCCAGCAGCGGCGGCAAGCGGCCC<br>GCCGCCACCAAGAAGGCCGGCCAGGCCAAGAAGAAGAA<br>GGGCAGCTACCCCTACGACGTGCCCGACTACGCCTGAGC<br>GGCCGCTTAATTAAGCTGCCTTCTGCGGGGCTTGCCTTCT<br>GGCCATGCCCTTCTTCTCTCCCTTGCACCTGTACCTCTTG |

| | | |
|---|---|---|
| | | GTCTTTGAATAAAGCCTGAGTAGGAAGTCTAGAAAAAA<br>AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA<br>AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA |
| ZF9-MQ1<br>без HA | 130 | GGGAAATAAGAGAGAAAAGAAGAGTAAGAAGAAATAT<br>AAGAGCCACCATGGCCCCCAAGAAGAAGCGGAAGGTGG<br>GCATCCACGGCGTGCCCGCCGCCGGCAGCAGCGGATCCC<br>TGGAGCCCGGCGAGAAACCTTACAAATGCCCCGAGTGC<br>GGCAAGAGCTTCAGCAGAAGCGACGATCTGGTGAGGCA<br>CCAAAGAACCCACACCGGCGAAAAACCTTACAAGTGTC<br>CCGAATGCGGAAAGTCCTTCAGCAGAGAGGACAATCTG<br>CACACCCACCAGAGAACACACACCGGAGAAAAGCCTTA<br>CAAGTGCCCCGAATGCGGCAAATCCTTTTCTAGAAGCGA<br>TCATCTGACCACCCACCAAAGAACACATACCGGCGAGA<br>AGCCTTACAAATGTCCCGAGTGCGGAAAGTCCTTCTCCC<br>AGAGAGCCAATCTGAGGGCTCATCAAAGGACCCATACC<br>GGCGAAAAGCCCTACAAATGCCCCGAGTGCGGAAAATC<br>CTTCAGCCAGCTGGCCCATCTGAGAGCCCACCAAAGGAC<br>ACACACCGGAGAGAAACCCTATAAGTGCCCCGAGTGTG<br>GAAAAAGCTTTTCCCAGAGGGCCAATCTGAGGGCCCATC<br>AGAGGACCCATACCGGAGAGAAGCCTTATAAATGTCCC<br>GAGTGCGGAAAAAGCTTCAGCGAGAGGAGCCATCTGAG<br>GGAACATCAAAGAACCCACACCGGCGAAAAACCCACCG<br>GAAAAAAGACCAGCGCTAGCGGCAGCGGCGGCGGCAGC<br>GGCGGCGCCCGGGACAGCAAGGTGGAGAACAAGACCAA<br>GAAGCTGCGGGTGTTCGAGGCCTTCGCCGGCATCGGCGC<br>CCAGCGGAAGGCCCTGGAGAAGGTGCGGAAGGACGAGT<br>ACGAGATCGTGGGCCTGGCCGAGTGGTACGTGCCCGCCA<br>TCGTGATGTACCAGGCCATCCACAACAACTTCCACACCA<br>AGCTGGAGTACAAGAGCGTGAGCCGGGAGGAGATGATC<br>GACTACCTGGAGAACAAGACCCTGAGCTGGAACAGCAA<br>GAACCCCGTGAGCAACGGCTACTGGAAGCGGAAGAAGG<br>ACGACGAGCTGAAGATCATCTACAACGCCATCAAGCTG<br>AGCGAGAAGGAGGGCAACATCTTCGACATCCGGGACCT<br>GTACAAGCGGACCCTGAAGAACATCGACCTGCTGACCTA<br>CAGCTTCCCCTGCCAGGACCTGAGCCAGCAGGGCATCCA |

| | | |
|---|---|---|
| | | GAAGGGCATGAAGCGGGGCAGCGGCACCCGGAGCGGCC<br>TGCTGTGGGAGATCGAGCGGGCCCTGGACAGCACCGAG<br>AAGAACGACCTGCCCAAGTACCTGCTGATGGAGAACGT<br>GGGCGCCCTGCTGCACAAGAAGAACGAGGAGGAGCTGA<br>ACCAGTGGAAGCAGAAGCTGGAGAGCCTGGGCTACCAG<br>AACAGCATCGAGGTGCTGAACGCCGCCGACTTCGGCAG<br>CAGCCAGGCCCGGCGGCGGGTGTTCATGATCAGCACCCT<br>GAACGAGTTCGTGGAGCTGCCCAAGGGCGACAAGAAGC<br>CCAAGAGCATCAAGAAGGTGCTGAACAAGATCGTGAGC<br>GAGAAGGACATCCTGAACAACCTGCTGAAGTACAACCT<br>GACCGAGTTCAAGAAAACCAAGAGCAACATCAACAAGG<br>CCAGCCTGATCGGCTACAGCAAGTTCAACAGCGAGGGCT<br>ACGTGTACGACCCCGAGTTCACCGGCCCCACCCTGACCG<br>CCAGCGGCGCCAACAGCCGGATCAAGATCAAGGACGGC<br>AGCAACATCCGGAAGATGAACAGCGACGAGACCTTCCT<br>GTACATCGGCTTCGACAGCCAGGACGGCAAGCGGGTGA<br>ACGAGATCGAGTTCCTGACCGAGAACCAGAAGATCTTCG<br>TGTGCGGCAACAGCATCAGCGTGGAGGTGCTGGAGGCC<br>ATCATCGACAAGATCGGCGGCCCCAGCAGCGGCGGCAA<br>GCGGCCCGCCGCCACCAAGAAGGCCGGCCAGGCCAAGA<br>AGAAGAAGGGCAGCTGAGCGGCCGCTTAATTAAGCTGC<br>CTTCTGCGGGGCTTGCCTTCTGGCCATGCCCTTCTTCTCT<br>CCCTTGCACCTGTACCTCTTGGTCTTTGAATAAAGCCTGA<br>GTAGGAAGTCTAGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA<br>AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA<br>AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA<br>AAAAAAAAAAAAAAA |

В некоторых вариантах осуществления репрессор экспрессии содержит нацеливающуюся функциональную группу, содержащую домен по типу "Zn-пальца" (например, содержащий аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO:11-14), и эффекторную функциональную группу, содержащую MQ1, например бактериальный MQ1 (например, SEQ ID NO: 19). В некоторых вариантах осуществления репрессор экспрессии содержит аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 28, 29, 30, 31, 32, 33, 129 и 145-149. Белковая последовательность данных иллюстративных репрессоров экспрессии раскрыта в таблице 9. В некоторых вариантах осуществления репрессор экспрессии, описанный в данном документе, содержит

аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 28-33, 129 или последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 99 или 100% идентичностью с ней или имеет не более чем 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 положение, отличающееся от нее.

Таблица 9. Аминокислотные последовательности иллюстративных эффекторов ZF-MQ1

| Название | SEQ ID NO: | ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ |
|---|---|---|
| ZF7-MQ1 (а. к.) | 28 | MAPKKKRKVGIHGVPAAGSSGSLEPGEKPYKCPECGKSFSR NDALTEHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSDCRDLARHQRTHTG EKPYKCPECGKSFSDPGHLVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFS QSGHLTEHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSREDNLHTHQRTHT GEKPYKCPECGKSFSTKNSLTEHQRTHTGEKPYKCPECGKSF SRADNLTEHQRTHTGEKPTGKKTSASGSGGGSGGARDSKVE NKTKKLRVFEAFAGIGAQRKALEKVRKDEYEIVGLAEWYVP AIVMYQAIHNNFHTKLEYKSVSREEMIDYLENKTLSWNSKN PVSNGYWKRKKDDELKIIYNAIKLSEKEGNIFDIRDLYKRTL KNIDLLTYSFPCQDLSQQGIQKGMKRGSGTRSGLLWEIERAL DSTEKNDLPKYLLMENVGALLHKKNEEELNQWKQKLESLG YQNSIEVLNAADFGSSQARRRVFMISTLNEFVELPKGDKKPK SIKKVLNKIVSEKDILNNLLKYNLTEFKKTKSNINKASLIGYS KFNSEGYVYDPEFTGPTLTASGANSRIKIKDGSNIRKMNSDE TFLYIGFDSQDGKRVNEIEFLTENQKIFVCGNSISVEVLEAIID KIGGPSSGGKRPAATKKAGQAKKKKGSYPYDVPDYA |
| ZF8-MQ1 (а. к.) | 29 | MAPKKKRKVGIHGVPAAGSSGSLEPGEKPYKCPECGKSFSRS DKLTEHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSRRDELNVHQRTHTGE KPYKCPECGKSFSRSDHLTNHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSS PADLTRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSRSDHLTNHQRTHTG EKPYKCPECGKSFSSKKALTEHQRTHTGEKPYKCPECGKSFS THLDLIRHQRTHTGEKPTGKKTSASGSGGGSGGARDSKVEN KTKKLRVFEAFAGIGAQRKALEKVRKDEYEIVGLAEWYVPA IVMYQAIHNNFHTKLEYKSVSREEMIDYLENKTLSWNSKNP VSNGYWKRKKDDELKIIYNAIKLSEKEGNIFDIRDLYKRTLK NIDLLTYSFPCQDLSQQGIQKGMKRGSGTRSGLLWEIERALD STEKNDLPKYLLMENVGALLHKKNEEELNQWKQKLESLGY |

| | | |
|---|---|---|
| | | QNSIEVLNAADFGSSQARRRVFMISTLNEFVELPKGDKKPKSI<br>KKVLNKIVSEKDILNNLLKYNLTEFKKTKSNINKASLIGYSKF<br>NSEGYVYDPEFTGPTLTASGANSRIKIKDGSNIRKMNSDETFL<br>YIGFDSQDGKRVNEIEFLTENQKIFVCGNSISVEVLEAIIDKIG<br>GPSSGGKRPAATKKAGQAKKKKGSYPYDVPDYA |
| ZF9-MQ1<br>(а. к.) | 30 | MAPKKKRKVGIHGVPAAGSSGSLEPGEKPYKCPECGKSFSRS<br>DDLVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSREDNLHTHQRTHTGE<br>KPYKCPECGKSFSRSDHLTTHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQ<br>RANLRAHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQLAHLRAHQRTHTG<br>EKPYKCPECGKSFSQRANLRAHQRTHTGEKPYKCPECGKSF<br>SERSHLREHQRTHTGEKPTGKKTSASGSGGGSGGARDSKVE<br>NKTKKLRVFEAFAGIGAQRKALEKVRKDEYEIVGLAEWYVP<br>AIVMYQAIHNNFHTKLEYKSVSREEMIDYLENKTLSWNSKN<br>PVSNGYWKRKKDDELKIIYNAIKLSEKEGNIFDIRDLYKRTL<br>KNIDLLTYSFPCQDLSQQGIQKGMKRGSGTRSGLLWEIERAL<br>DSTEKNDLPKYLLMENVGALLHKKNEEELNQWKQKLESLG<br>YQNSIEVLNAADFGSSQARRRVFMISTLNEFVELPKGDKKPK<br>SIKKVLNKIVSEKDILNNLLKYNLTEFKKTKSNINKASLIGYS<br>KFNSEGYVYDPEFTGPTLTASGANSRIKIKDGSNIRKMNSDE<br>TFLYIGFDSQDGKRVNEIEFLTENQKIFVCGNSISVEVLEAIID<br>KIGGPSSGGKRPAATKKAGQAKKKKGSYPYDVPDYA |
| ZF10-MQ1<br>(а. к.) | 31 | MAPKKKRKVGIHGVPAAGSSGSLEPGEKPYKCPECGKSFSQ<br>SGDLRRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQSGHLTEHQRTHTG<br>EKPYKCPECGKSFSERSHLREHQRTHTGEKPYKCPECGKSFS<br>DPGHLVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSRNDTLTEHQRTHT<br>GEKPYKCPECGKSFSRADNLTEHQRTHTGEKPYKCPECGKS<br>FSTHLDLIRHQRTHTGEKPTGKKTSASGSGGGSGGARDSKVE<br>NKTKKLRVFEAFAGIGAQRKALEKVRKDEYEIVGLAEWYVP<br>AIVMYQAIHNNFHTKLEYKSVSREEMIDYLENKTLSWNSKN<br>PVSNGYWKRKKDDELKIIYNAIKLSEKEGNIFDIRDLYKRTL<br>KNIDLLTYSFPCQDLSQQGIQKGMKRGSGTRSGLLWEIERAL<br>DSTEKNDLPKYLLMENVGALLHKKNEEELNQWKQKLESLG<br>YQNSIEVLNAADFGSSQARRRVFMISTLNEFVELPKGDKKPK<br>SIKKVLNKIVSEKDILNNLLKYNLTEFKKTKSNINKASLIGYS<br>KFNSEGYVYDPEFTGPTLTASGANSRIKIKDGSNIRKMNSDE |

| | | |
|---|---|---|
| | | TFLYIGFDSQDGKRVNEIEFLTENQKIFVCGNSISVEVLEAIID<br>KIGGPSSGGKRPAATKKAGQAKKKKGSYPYDVPDYA |
| ZF11-MQ1<br>(а. к.) | 32 | MAPKKKRKVGIHGVPAAGSSGSLEPGEKPYKCPECGKSFSH<br>TGHLLEHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSSKKALTEHQRTHTG<br>EKPYKCPECGKSFSDCRDLARHQRTHTGEKPYKCPECGKSFS<br>HTGHLLEHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSRNDALTEHQRTHT<br>GEKPYKCPECGKSFSQSGDLRRHQRTHTGEKPYKCPECGKS<br>FSDSGNLRVHQRTHTGEKPTGKKTSASGSGGGSGGARDSKV<br>ENKTKKLRVFEAFAGIGAQRKALEKVRKDEYEIVGLAEWYV<br>PAIVMYQAIHNNFHTKLEYKSVSREEMIDYLENKTLSWNSK<br>NPVSNGYWKRKKDDELKIIYNAIKLSEKEGNIFDIRDLYKRT<br>LKNIDLLTYSFPCQDLSQQGIQKGMKRGSGTRSGLLWEIERA<br>LDSTEKNDLPKYLLMENVGALLHKKNEEELNQWKQKLESL<br>GYQNSIEVLNAADFGSSQARRRVFMISTLNEFVELPKGDKKP<br>KSIKKVLNKIVSEKDILNNLLKYNLTEFKKTKSNINKASLIGY<br>SKFNSEGYVYDPEFTGPTLTASGANSRIKIKDGSNIRKMNSD<br>ETFLYIGFDSQDGKRVNEIEFLTENQKIFVCGNSISVEVLEAII<br>DKIGGPSSGGKRPAATKKAGQAKKKKGSYPYDVPDYA |
| ZF12-MQ1<br>(а. к.) | 33 | MAPKKKRKVGIHGVPAAGSSGSLEPGEKPYKCPECGKSFSQ<br>SSSLVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSRSDHLTNHQRTHTGE<br>KPYKCPECGKSFSQLAHLRAHQRTHTGEKPYKCPECGKSFS<br>QSSNLVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSRSDNLVRHQRTHT<br>GEKPYKCPECGKSFSRSDELVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSF<br>SQLAHLRAHQRTHTGEKPTGKKTSASGSGGGSGGARDSKVE<br>NKTKKLRVFEAFAGIGAQRKALEKVRKDEYEIVGLAEWYVP<br>AIVMYQAIHNNFHTKLEYKSVSREEMIDYLENKTLSWNSKN<br>PVSNGYWKRKKDDELKIIYNAIKLSEKEGNIFDIRDLYKRTL<br>KNIDLLTYSFPCQDLSQQGIQKGMKRGSGTRSGLLWEIERAL<br>DSTEKNDLPKYLLMENVGALLHKKNEEELNQWKQKLESLG<br>YQNSIEVLNAADFGSSQARRRVFMISTLNEFVELPKGDKKPK<br>SIKKVLNKIVSEKDILNNLLKYNLTEFKKTKSNINKASLIGYS<br>KFNSEGYVYDPEFTGPTLTASGANSRIKIKDGSNIRKMNSDE<br>TFLYIGFDSQDGKRVNEIEFLTENQKIFVCGNSISVEVLEAIID<br>KIGGPSSGGKRPAATKKAGQAKKKKGSYPYDVPDYA |
| ZF9-MQ1 | 129 | MAPKKKRKVGIHGVPAAGSSGSLEPGEKPYKCPECGKSFSRS |

| | | |
|---|---|---|
| без HA | | DDLVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSREDNLHTHQRTHTGE<br>KPYKCPECGKSFSRSDHLTTHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQ<br>RANLRAHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQLAHLRAHQRTHTG<br>EKPYKCPECGKSFSQRANLRAHQRTHTGEKPYKCPECGKSF<br>SERSHLREHQRTHTGEKPTGKKTSASGSGGGSGGARDSKVE<br>NKTKKLRVFEAFAGIGAQRKALEKVRKDEYEIVGLAEWYVP<br>AIVMYQAIHNNFHTKLEYKSVSREEMIDYLENKTLSWNSKN<br>PVSNGYWKRKKDDELKIIYNAIKLSEKEGNIFDIRDLYKRTL<br>KNIDLLTYSFPCQDLSQQGIQKGMKRGSGTRSGLLWEIERAL<br>DSTEKNDLPKYLLMENVGALLHKKNEEELNQWKQKLESLG<br>YQNSIEVLNAADFGSSQARRRVFMISTLNEFVELPKGDKKPK<br>SIKKVLNKIVSEKDILNNLLKYNLTEFKKTKSNINKASLIGYS<br>KFNSEGYVYDPEFTGPTLTASGANSRIKIKDGSNIRKMNSDE<br>TFLYIGFDSQDGKRVNEIEFLTENQKIFVCGNSISVEVLEAIID<br>KIGGPSSGGKRPAATKKAGQAKKKKGS |
| ZF9-MQ1+фрагмент1 tPT2A (а. к.) | 133 | MAPKKKRKVGIHGVPAAGSSGSLEPGEKPYKCPECGKSFSRS<br>DDLVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSREDNLHTHQRTHTGE<br>KPYKCPECGKSFSRSDHLTTHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQ<br>RANLRAHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQLAHLRAHQRTHTG<br>EKPYKCPECGKSFSQRANLRAHQRTHTGEKPYKCPECGKSF<br>SERSHLREHQRTHTGEKPTGKKTSASGSGGGSGGARDSKVE<br>NKTKKLRVFEAFAGIGAQRKALEKVRKDEYEIVGLAEWYVP<br>AIVMYQAIHNNFHTKLEYKSVSREEMIDYLENKTLSWNSKN<br>PVSNGYWKRKKDDELKIIYNAIKLSEKEGNIFDIRDLYKRTL<br>KNIDLLTYSFPCQDLSQQGIQKGMKRGSGTRSGLLWEIERAL<br>DSTEKNDLPKYLLMENVGALLHKKNEEELNQWKQKLESLG<br>YQNSIEVLNAADFGSSQARRRVFMISTLNEFVELPKGDKKPK<br>SIKKVLNKIVSEKDILNNLLKYNLTEFKKTKSNINKASLIGYS<br>KFNSEGYVYDPEFTGPTLTASGANSRIKIKDGSNIRKMNSDE<br>TFLYIGFDSQDGKRVNEIEFLTENQKIFVCGNSISVEVLEAIID<br>KIGGPSSGGKRPAATKKAGQAKKKKGSYPYDVPDYAGSYP<br>YDVPDYAATNFSLLKQAGDVEENPG |
| ZF7-MQ1 без HA (а. к.) | 145 | MAPKKKRKVGIHGVPAAGSSGSLEPGEKPYKCPECGKSFSR<br>NDALTEHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSDCRDLARHQRTHTG<br>EKPYKCPECGKSFSDPGHLVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFS |

| | | |
|---|---|---|
| | | QSGHLTEHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSREDNLHTHQRTHT<br>GEKPYKCPECGKSFSTKNSLTEHQRTHTGEKPYKCPECGKSF<br>SRADNLTEHQRTHTGEKPTGKKTSASGSGGGSGGARDSKVE<br>NKTKKLRVFEAFAGIGAQRKALEKVRKDEYEIVGLAEWYVP<br>AIVMYQAIHNNFHTKLEYKSVSREEMIDYLENKTLSWNSKN<br>PVSNGYWKRKKDDELKIIYNAIKLSEKEGNIFDIRDLYKRTL<br>KNIDLLTYSFPCQDLSQQGIQKGMKRGSGTRSGLLWEIERAL<br>DSTEKNDLPKYLLMENVGALLHKKNEEELNQWKQKLESLG<br>YQNSIEVLNAADFGSSQARRRVFMISTLNEFVELPKGDKKPK<br>SIKKVLNKIVSEKDILNNLLKYNLTEFKKTKSNINKASLIGYS<br>KFNSEGYVYDPEFTGPTLTASGANSRIKIKDGSNIRKMNSDE<br>TFLYIGFDSQDGKRVNEIEFLTENQKIFVCGNSISVEVLEAIID<br>KIGGPSSGGKRPAATKKAGQAKKKKGS |
| ZF8-MQ1 без HA (а. к.) | 146 | MAPKKKRKVGIHGVPAAGSSGSLEPGEKPYKCPECGKSFSRS<br>DKLTEHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSRRDELNVHQRTHTGE<br>KPYKCPECGKSFSRSDHLTNHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSS<br>PADLTRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSRSDHLTNHQRTHTG<br>EKPYKCPECGKSFSSKKALTEHQRTHTGEKPYKCPECGKSFS<br>THLDLIRHQRTHTGEKPTGKKTSASGSGGGSGGARDSKVEN<br>KTKKLRVFEAFAGIGAQRKALEKVRKDEYEIVGLAEWYVPA<br>IVMYQAIHNNFHTKLEYKSVSREEMIDYLENKTLSWNSKNP<br>VSNGYWKRKKDDELKIIYNAIKLSEKEGNIFDIRDLYKRTLK<br>NIDLLTYSFPCQDLSQQGIQKGMKRGSGTRSGLLWEIERALD<br>STEKNDLPKYLLMENVGALLHKKNEEELNQWKQKLESLGY<br>QNSIEVLNAADFGSSQARRRVFMISTLNEFVELPKGDKKPKSI<br>KKVLNKIVSEKDILNNLLKYNLTEFKKTKSNINKASLIGYSKF<br>NSEGYVYDPEFTGPTLTASGANSRIKIKDGSNIRKMNSDETFL<br>YIGFDSQDGKRVNEIEFLTENQKIFVCGNSISVEVLEAIIDKIG<br>GPSSGGKRPAATKKAGQAKKKKGS |
| ZF10-MQ1 без HA (а. к.) | 147 | MAPKKKRKVGIHGVPAAGSSGSLEPGEKPYKCPECGKSFSQ<br>SGDLRRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQSGHLTEHQRTHTG<br>EKPYKCPECGKSFSERSHLREHQRTHTGEKPYKCPECGKSFS<br>DPGHLVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSRNDTLTEHQRTHT<br>GEKPYKCPECGKSFSRADNLTEHQRTHTGEKPYKCPECGKS<br>FSTHLDLIRHQRTHTGEKPTGKKTSASGSGGGSGGARDSKVE |

| | | |
|---|---|---|
| | | NKTKKLRVFEAFAGIGAQRKALEKVRKDEYEIVGLAEWYVP<br>AIVMYQAIHNNFHTKLEYKSVSREEMIDYLENKTLSWNSKN<br>PVSNGYWKRKKDDELKIIYNAIKLSEKEGNIFDIRDLYKRTL<br>KNIDLLTYSFPCQDLSQQGIQKGMKRGSGTRSGLLWEIERAL<br>DSTEKNDLPKYLLMENVGALLHKKNEEELNQWKQKLESLG<br>YQNSIEVLNAADFGSSQARRRVFMISTLNEFVELPKGDKKPK<br>SIKKVLNKIVSEKDILNNLLKYNLTEFKKTKSNINKASLIGYS<br>KFNSEGYVYDPEFTGPTLTASGANSRIKIKDGSNIRKMNSDE<br>TFLYIGFDSQDGKRVNEIEFLTENQKIFVCGNSISVEVLEAIID<br>KIGGPSSGGKRPAATKKAGQAKKKKGS |
| ZF11-MQ1 без HA (а. к.) | 148 | MAPKKKRKVGIHGVPAAGSSGSLEPGEKPYKCPECGKSFSH<br>TGHLLEHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSSKKALTEHQRTHTG<br>EKPYKCPECGKSFSDCRDLARHQRTHTGEKPYKCPECGKSFS<br>HTGHLLEHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSRNDALTEHQRTHT<br>GEKPYKCPECGKSFSQSGDLRRHQRTHTGEKPYKCPECGKS<br>FSDSGNLRVHQRTHTGEKPTGKKTSASGSGGGSGGARDSKV<br>ENKTKKLRVFEAFAGIGAQRKALEKVRKDEYEIVGLAEWYV<br>PAIVMYQAIHNNFHTKLEYKSVSREEMIDYLENKTLSWNSK<br>NPVSNGYWKRKKDDELKIIYNAIKLSEKEGNIFDIRDLYKRT<br>LKNIDLLTYSFPCQDLSQQGIQKGMKRGSGTRSGLLWEIERA<br>LDSTEKNDLPKYLLMENVGALLHKKNEEELNQWKQKLESL<br>GYQNSIEVLNAADFGSSQARRRVFMISTLNEFVELPKGDKKP<br>KSIKKVLNKIVSEKDILNNLLKYNLTEFKKTKSNINKASLIGY<br>SKFNSEGYVYDPEFTGPTLTASGANSRIKIKDGSNIRKMNSD<br>ETFLYIGFDSQDGKRVNEIEFLTENQKIFVCGNSISVEVLEAII<br>DKIGGPSSGGKRPAATKKAGQAKKKKGS |
| ZF12-MQ1 без HA (а. к.) | 149 | MAPKKKRKVGIHGVPAAGSSGSLEPGEKPYKCPECGKSFSQ<br>SSSLVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSRSDHLTNHQRTHTGE<br>KPYKCPECGKSFSQLAHLRAHQRTHTGEKPYKCPECGKSFS<br>QSSNLVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSRSDNLVRHQRTHT<br>GEKPYKCPECGKSFSRSDELVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSF<br>SQLAHLRAHQRTHTGEKPTGKKTSASGSGGGSGGARDSKVE<br>NKTKKLRVFEAFAGIGAQRKALEKVRKDEYEIVGLAEWYVP<br>AIVMYQAIHNNFHTKLEYKSVSREEMIDYLENKTLSWNSKN<br>PVSNGYWKRKKDDELKIIYNAIKLSEKEGNIFDIRDLYKRTL |

| | | |
|---|---|---|
| | | KNIDLLTYSFPCQDLSQQGIQKGMKRGSGTRSGLLWEIERAL<br>DSTEKNDLPKYLLMENVGALLHKKNEEELNQWKQKLESLG<br>YQNSIEVLNAADFGSSQARRRVFMISTLNEFVELPKGDKKPK<br>SIKKVLNKIVSEKDILNNLLKYNLTEFKKTKSNINKASLIGYS<br>KFNSEGYVYDPEFTGPTLTASGANSRIKIKDGSNIRKMNSDE<br>TFLYIGFDSQDGKRVNEIEFLTENQKIFVCGNSISVEVLEAIID<br>KIGGPSSGGKRPAATKKAGQAKKKKGS |

В некоторых вариантах осуществления репрессор экспрессии содержит нацеливающуюся функциональную группу, содержащую домен по типу "Zn-пальца" (например, содержащий аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO:11-14), и эффекторную функциональную группу, содержащую MQ1, например бактериальный MQ1 (например, SEQ ID NO: 87).

В некоторых вариантах осуществления репрессор экспрессии содержит нацеливающуюся функциональную группу, содержащую домен по типу "Zn-пальца" (например, кодируемый нуклеотидной последовательностью под любым из SEQ ID NO: 166-168), и эффекторную функциональную группу, содержащую MQ1, например бактериальный MQ1 (например, кодируемый нуклеотидной последовательностью под SEQ ID NO: 52). В некоторых вариантах осуществления репрессоры экспрессии кодируются последовательностью нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 157, 158 или 159. Последовательности нуклеиновой кислоты данных иллюстративных репрессоров экспрессии раскрыты в таблице 16. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота, описанная в данном документе, содержит последовательность нуклеиновой кислоты под любым из SEQ ID NO: 166-168 или последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 99 или 100% идентичностью с ней или имеет не более чем 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 положение, отличающееся от нее. В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты содержит поли-А-последовательность, а в других вариантах осуществления, нуклеиновая кислота не содержит поли-А-последовательность. Например, в некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота, описанная в данном документе, содержит последовательность в соответствии с любым из SEQ ID NO: 166-168 (или последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 99 или 100% идентичностью с ней или имеет не более чем 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 положение, отличающееся от нее), но с отсутствующей 3'-поли-А-последовательностью или присутствующей 3'-поли-А-последовательностью более короткой длины.

Таблица 16. Нуклеотидные последовательности иллюстративных эффекторов ZF-MQ1, специфичных для мыши

| Название | SEQ ID NO: | ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ |
|---|---|---|

| | | |
|---|---|---|
| ZF15-MQ1, нт | 166 | AGGAAATAAGAGAGAAAAGAAGAGTAAGAAGAAATATA<br>AGAGCCACCATGGCCCCCAAGAAGAAGCGGAAGGTGGGC<br>ATCCACGGCGTGCCCGCCGCCGGCAGCAGCGGATCCCTTG<br>AGCCCGGAGAAAAGCCATACAAATGTCCTGAATGCGGAA<br>AGTCATTTTCTACGAGCGGCGAACTCGTGCGGCACCAAAG<br>GACTCATACCGGCGAAAAGCCTTACAAATGCCCGGAGTG<br>CGGAAAAAGCTTCTCCGAGCGCTCGCACTTGCGGGAACA<br>CCAGCGAACCCACACAGGGGAGAAACCGTATAAGTGCCC<br>AGAGTGCGGCAAATCGTTCTCCCGGAACGACACCCTGACC<br>GAACACCAACGCACTCATACTGGCGAAAAACCTTACAAG<br>TGCCCTGAGTGTGGAAAGAGCTTCTCCCGCGCCGATAACC<br>TGACCGAGCACCAGCGGACCCATACCGGGGAAAAGCCGT<br>ACAAGTGTCCGGAATGCGGCAAAAGCTTCAGCACCTCGG<br>GTTCCCTGGTCCGGCATCAGAGAACTCACACCGGAGAGA<br>AACCCTATAAGTGTCCTGAGTGCGGGAAGTCCTTTTCATC<br>GCCCGCGGACCTGACTAGACACCAGAGGACCCACACCGG<br>GGAGAAGCCCTACAAGTGCCCCGAATGTGGAAAGTCCTT<br>CTCCGACTCCGGCAACCTCCGGGTGCACCAGCGCACCCAC<br>ACTGGAGAGAAGCCGACCGGAAAGAAAACTTCCGCCTCC<br>GGTTCGGGAGGAGGCTCAGGAGGAGCGAGAGATTCCAAG<br>GTCGAGAACAAGACCAAGAAGCTGCGGGTGTTCGAGGCC<br>TTTGCTGGCATCGGAGCCCAGAGGAAGGCCCTCGAGAAG<br>GTCCGCAAGGATGAGTACGAGATCGTGGGACTCGCGGAG<br>TGGTACGTGCCCGCCATTGTGATGTACCAGGCCATCCATA<br>ACAACTTCCACACTAAGCTGGAGTACAAGTCCGTGTCCCG<br>GGAGGAAATGATTGACTACCTGGAGAATAAGACCCTGTC<br>ATGGAACTCTAAGAACCCCGTGTCGAACGGTTACTGGAA<br>GAGAAAGAAGGATGACGAACTGAAGATTATCTACAACGC<br>GATCAAGCTGAGCGAGAAGGAGGGCAACATCTTCGACAT<br>CCGGGACCTCTACAAGCGCACCTTGAAGAACATCGATCTG<br>CTGACCTACTCCTTCCCGTGCCAAGACCTGAGCCAGCAGG<br>GCATCCAGAAGGGGATGAAACGGGGCTCCGGTACTCGCA<br>GCGGCTTGCTGTGGGAAATTGAGCGGGCCCTGGATAGCA<br>CCGAGAAGAACGACTTGCCGAAGTATCTTCTCATGGAAA<br>ACGTCGGGGCTCTCCTTCACAAGAAGAACGAGGAAGAAC |

| | | |
|---|---|---|
| | | TGAACCAGTGGAAGCAAAAGCTGGAATCCCTCGGATACC<br>AGAACTCCATTGAGGTCCTGAACGCCGCCGACTTCGGATC<br>GTCGCAAGCCAGACGGAGGGTGTTCATGATTAGCACTCTG<br>AACGAATTCGTGGAACTGCCGAAGGGCGACAAGAAGCCT<br>AAGTCCATCAAGAAGGTGCTGAACAAGATCGTGTCCGAG<br>AAGGACATTCTCAACAATCTGCTGAAGTACAACCTGACAG<br>AGTTCAAGAAAACCAAGTCCAACATCAACAAGGCCTCCTT<br>GATTGGTTACTCAAAGTTCAACAGCGAGGGATACGTGTAC<br>GACCCCGAATTCACTGGACCCACTCTGACCGCCTCCGGAG<br>CAAACTCTAGGATTAAGATCAAGGACGGCTCCAACATCC<br>GGAAGATGAACTCCGACGAAACCTTTCTGTACATCGGCTT<br>CGACTCGCAAGACGGAAAGCGCGTGAACGAGATCGAATT<br>TCTTACCGAAAACCAGAAGATCTTCGTGTGCGGCAATTCA<br>ATCTCCGTGGAAGTCCTGGAAGCGATTATCGACAAGATCG<br>GAGGCAGTGGTGGAAAGCGCCCAGCAGCCACTAAGAAGG<br>CCGGACAGGCCAAGAAGAAGAAGGGATCCTACCCTTACG<br>ATGTGCCGGATTACGCTTGAGCGGCCGCTTAATTAAGCTG<br>CCTTCTGCGGGGCTTGCCTTCTGGCCATGCCCTTCTTCTCT<br>CCCTTGCACCTGTACCTCTTGGTCTTTGAATAAAGCCTGA<br>GTAGGAAGTCTAGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA<br>AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA<br>AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA<br>AAAAAAAAAAAAA |
| ZF16-MQ1, нт | 167 | AGGAAATAAGAGAGAAAAGAAGAGTAAGAAGAAATATA<br>AGAGCCACCATGGCCCCCAAGAAGAAGCGGAAGGTGGGC<br>ATCCACGGCGTGCCCGCCGCCGGCAGCAGCGGATCCCTG<br>GAACCCGGAGAAAAACCTTATAAGTGCCCTGAATGCGGA<br>AAGTCATTCTCGAGGTCGGACAAGCTCGTGCGGCACCAG<br>AGGACACACACCGGGGAAAAGCCATACAAGTGTCCCGAA<br>TGTGGAAAGTCCTTCAGCCAACGCGCCAACCTGAGAGCTC<br>ATCAGCGGACTCACACTGGCGAAAAACCGTACAAATGCC<br>CCGAATGCGGCAAAAGCTTCTCCCGCGCCGACAACTTGAC<br>CGAGCACCAGCGGACCCATACCGGCGAAAAGCCGTACAA<br>GTGCCCGGAGTGTGGGAAGTCGTTCAGCCAGTCCTCTTCC<br>CTCGTGCGCCACCAACGCACCCATACTGGGGAGAAGCCCT |

| | | |
|---|---|---|
| | | ATAAGTGTCCTGAGTGTGGCAAATCATTCAGCGATAAGAA<br>GGATCTTACCCGGCACCAACGGACTCATACCGGAGAGAA<br>GCCTTACAAGTGCCCCGAGTGCGGAAAGAGCTTCTCGTCC<br>CCGGCGGACCTGACTAGACACCAGCGCACCCACACCGGA<br>GAAAAGCCCTACAAGTGCCCAGAGTGCGGGAAGTCCTTTT<br>CCCAATCCGGTCACCTGACTGAGCACCAGAGAACCCACA<br>CGGGAGAGAAACCGACCGGAAAGAAAACCTCCGCCTCCG<br>GTTCGGGAGGAGGCTCAGGAGGAGCGAGAGATTCCAAGG<br>TCGAGAACAAGACCAAGAAGCTGCGGGTGTTCGAGGCCT<br>TTGCTGGCATCGGAGCCCAGAGGAAGGCCCTCGAGAAGG<br>TCCGCAAGGATGAGTACGAGATCGTGGGACTCGCGGAGT<br>GGTACGTGCCCGCCATTGTGATGTACCAGGCCATCCATAA<br>CAACTTCCACACTAAGCTGGAGTACAAGTCCGTGTCCCGG<br>GAGGAAATGATTGACTACCTGGAGAATAAGACCCTGTCA<br>TGGAACTCTAAGAACCCCGTGTCGAACGGTTACTGGAAG<br>AGAAAGAAGGATGACGAACTGAAGATTATCTACAACGCG<br>ATCAAGCTGAGCGAGAAGGAGGGCAACATCTTCGACATC<br>CGGGACCTCTACAAGCGCACCTTGAAGAACATCGATCTGC<br>TGACCTACTCCTTCCCGTGCCAAGACCTGAGCCAGCAGGG<br>CATCCAGAAGGGGATGAAACGGGGCTCCGGTACTCGCAG<br>CGGCTTGCTGTGGGAAATTGAGCGGGCCCTGGATAGCACC<br>GAGAAGAACGACTTGCCGAAGTATCTTCTCATGGAAAAC<br>GTCGGGGCTCTCCTTCACAAGAAGAACGAGGAAGAACTG<br>AACCAGTGGAAGCAAAAGCTGGAATCCCTCGGATACCAG<br>AACTCCATTGAGGTCCTGAACGCCGCCGACTTCGGATCGT<br>CGCAAGCCAGACGGAGGGTGTTCATGATTAGCACTCTGA<br>ACGAATTCGTGGAACTGCCGAAGGGCGACAAGAAGCCTA<br>AGTCCATCAAGAAGGTGCTGAACAAGATCGTGTCCGAGA<br>AGGACATTCTCAACAATCTGCTGAAGTACAACCTGACAGA<br>GTTCAAGAAAACCAAGTCCAACATCAACAAGGCCTCCTTG<br>ATTGGTTACTCAAAGTTCAACAGCGAGGGATACGTGTACG<br>ACCCCGAATTCACTGGACCCACTCTGACCGCCTCCGGAGC<br>AAACTCTAGGATTAAGATCAAGGACGGCTCCAACATCCG<br>GAAGATGAACTCCGACGAAACCTTTCTGTACATCGGCTTC<br>GACTCGCAAGACGGAAAGCGCGTGAACGAGATCGAATTT |

| | | |
|---|---|---|
| | | CTTACCGAAAACCAGAAGATCTTCGTGTGCGGCAATTCAA<br>TCTCCGTGGAAGTCCTGGAAGCGATTATCGACAAGATCGG<br>AGGCAGTGGTGGAAAGCGCCCAGCAGCCACTAAGAAGGC<br>CGGACAGGCCAAGAAGAAGAAGGGATCCTACCCTTACGA<br>TGTGCCGGATTACGCTTGAGCGGCCGCTTAATTAAGCTGC<br>CTTCTGCGGGGCTTGCCTTCTGGCCATGCCCTTCTTCTCTC<br>CCTTGCACCTGTACCTCTTGGTCTTTGAATAAAGCCTGAGT<br>AGGAAGTCTAGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA<br>AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA<br>AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA<br>AAAAAAAAAAA |
| ZF17-MQ1, нт | 168 | AGGAAATAAGAGAGAAAAGAAGAGTAAGAAGAAATATA<br>AGAGCCACCATGGCCCCCAAGAAGAAGCGGAAGGTGGGC<br>ATCCACGGCGTGCCCGCCGCCGGCAGCAGCGGATCCTTGG<br>AACCCGGAGAAAAGCCATACAAATGCCCCGAATGCGGAA<br>AGTCGTTCAGCCAGTCCGGCGACCTCAGACGGCACCAAC<br>GGACTCACACCGGCGAAAAACCGTACAAGTGCCCAGAGT<br>GCGGCAAAAGCTTTAGCCAGTCGGGCGATCTGCGGAGAC<br>ATCAGCGCACTCACACTGGTGAAAAGCCCTACAAGTGTCC<br>TGAGTGCGGGAAGTCCTTCAGCGAGCGCTCCCATCTTCGC<br>GAGCACCAGAGAACCCACACTGGAGAAAAACCTTATAAG<br>TGCCCTGAGTGTGGCAAATCCTTCTCAACCACCGGCAACC<br>TGACTGTGCACCAGCGGACCCACACAGGGGAGAAGCCTT<br>ACAAGTGCCCGGAGTGTGGGAAGTCATTCTCCCATCGGAC<br>GACCCTGACCAACCACCAGAGGACCCATACTGGCGAAAA<br>GCCGTATAAGTGTCCGGAGTGCGGAAAGAGCTTCTCCGAC<br>TCCGGAAACCTCAGGGTGCACCAACGCACCCACACCGGA<br>GAGAAGCCGTACAAATGTCCCGAATGTGGAAAGTCCTTCT<br>CCCAATCCTCTTCGCTGGTCCGGCACCAGCGAACTCATAC<br>CGGGGAAAAGCCCACCGGAAAGAAAACCTCGGCCTCCGG<br>TTCGGGAGGAGGCTCAGGAGGAGCGAGAGATTCCAAGGT<br>CGAGAACAAGACCAAGAAGCTGCGGGTGTTCGAGGCCTT<br>TGCTGGCATCGGAGCCCAGAGGAAGGCCCTCGAGAAGGT<br>CCGCAAGGATGAGTACGAGATCGTGGGACTCGCGGAGTG<br>GTACGTGCCCGCCATTGTGATGTACCAGGCCATCCATAAC |

| | | |
|---|---|---|
| | | AACTTCCACACTAAGCTGGAGTACAAGTCCGTGTCCCGGG<br>AGGAAATGATTGACTACCTGGAGAATAAGACCCTGTCAT<br>GGAACTCTAAGAACCCCGTGTCGAACGGTTACTGGAAGA<br>GAAAGAAGGATGACGAACTGAAGATTATCTACAACGCGA<br>TCAAGCTGAGCGAGAAGGAGGGCAACATCTTCGACATCC<br>GGGACCTCTACAAGCGCACCTTGAAGAACATCGATCTGCT<br>GACCTACTCCTTCCCGTGCCAAGACCTGAGCCAGCAGGGC<br>ATCCAGAAGGGGATGAAACGGGGCTCCGGTACTCGCAGC<br>GGCTTGCTGTGGGAAATTGAGCGGGCCCTGGATAGCACC<br>GAGAAGAACGACTTGCCGAAGTATCTTCTCATGGAAAAC<br>GTCGGGGCTCTCCTTCACAAGAAGAACGAGGAAGAACTG<br>AACCAGTGGAAGCAAAAGCTGGAATCCCTCGGATACCAG<br>AACTCCATTGAGGTCCTGAACGCCGCCGACTTCGGATCGT<br>CGCAAGCCAGACGGAGGGTGTTCATGATTAGCACTCTGA<br>ACGAATTCGTGGAACTGCCGAAGGGCGACAAGAAGCCTA<br>AGTCCATCAAGAAGGTGCTGAACAAGATCGTGTCCGAGA<br>AGGACATTCTCAACAATCTGCTGAAGTACAACCTGACAGA<br>GTTCAAGAAAACCAAGTCCAACATCAACAAGGCCTCCTTG<br>ATTGGTTACTCAAAGTTCAACAGCGAGGGATACGTGTACG<br>ACCCCGAATTCACTGGACCCACTCTGACCGCCTCCGGAGC<br>AAACTCTAGGATTAAGATCAAGGACGGCTCCAACATCCG<br>GAAGATGAACTCCGACGAAACCTTTCTGTACATCGGCTTC<br>GACTCGCAAGACGGAAAGCGCGTGAACGAGATCGAATTT<br>CTTACCGAAAACCAGAAGATCTTCGTGTGCGGCAATTCAA<br>TCTCCGTGGAAGTCCTGGAAGCGATTATCGACAAGATCGG<br>AGGCAGTGGTGGAAAGCGCCCAGCAGCCACTAAGAAGGC<br>CGGACAGGCCAAGAAGAAGAAGGGATCCTACCCTTACGA<br>TGTGCCGGATTACGCTTGAGCGGCCGCTTAATTAAGCTGC<br>CTTCTGCGGGGCTTGCCTTCTGGCCATGCCCTTCTTCTCTC<br>CCTTGCACCTGTACCTCTTGGTCTTTGAATAAAGCCTGAGT<br>AGGAAGTCTAGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA<br>AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA<br>AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA<br>AAAAAAAAAAA |

В некоторых вариантах осуществления репрессор экспрессии содержит

нацеливающуюся функциональную группу, содержащую домен по типу "Zn-пальца" (например, содержащий аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO:154-156), и эффекторную функциональную группу, содержащую MQ1, например бактериальный MQ1 (например, SEQ ID NO: 19). В некоторых вариантах осуществления репрессор экспрессии содержит аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 160-165. Белковые последовательности данных иллюстративных репрессоров экспрессии раскрыта в таблице 17. В некоторых вариантах осуществления репрессор экспрессии, описанный в данном документе, содержит аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 160-165 или последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 99 или 100% идентичностью с ней или имеет не более чем 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 положение, отличающееся от нее.

Таблица 17. Аминокислотные последовательности иллюстративных эффекторов ZF-MQ1

| Название | SEQ ID NO: | ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ |
|---|---|---|
| ZF15-MQ1, а. к. | 160 | MAPKKKRKVGIHGVPAAGSSGSLEPGEKPYKCPECGKSFSTSG ELVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSERSHLREHQRTHTGEKPY KCPECGKSFSRNDTLTEHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSRADNL TEHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSTSGSLVRHQRTHTGEKPYKC PECGKSFSSPADLTRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSDSGNLRVH QRTHTGEKPTGKKTSASGSGGGSGGARDSKVENKTKKLRVFE AFAGIGAQRKALEKVRKDEYEIVGLAEWYVPAIVMYQAIHNNF HTKLEYKSVSREEMIDYLENKTLSWNSKNPVSNGYWKRKKDD ELKIIYNAIKLSEKEGNIFDIRDLYKRTLKNIDLLTYSFPCQDLSQ QGIQKGMKRGSGTRSGLLWEIERALDSTEKNDLPKYLLMENV GALLHKKNEEELNQWKQKLESLGYQNSIEVLNAADFGSSQAR RRVFMISTLNEFVELPKGDKKPKSIKKVLNKIVSEKDILNNLLK YNLTEFKKTKSNINKASLIGYSKFNSEGYVYDPEFTGPTLTASG ANSRIKIKDGSNIRKMNSDETFLYIGFDSQDGKRVNEIEFLTENQ KIFVCGNSISVEVLEAIIDKIGGSGGKRPAATKKAGQAKKKKGS YPYDVPDYA |
| ZF16-MQ1, а. к. | 161 | MAPKKKRKVGIHGVPAAGSSGSLEPGEKPYKCPECGKSFSRSD KLVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQRANLRAHQRTHTGEKP YKCPECGKSFSRADNLTEHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQSSSL VRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSDKKDLTRHQRTHTGEKPYK |

| | | |
|---|---|---|
| | | CPECGKSFSSPADLTRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQSGHLTE<br>HQRTHTGEKPTGKKTSASGSGGGSGGARDSKVENKTKKLRVF<br>EAFAGIGAQRKALEKVRKDEYEIVGLAEWYVPAIVMYQAIHN<br>NFHTKLEYKSVSREEMIDYLENKTLSWNSKNPVSNGYWKRKK<br>DDELKIIYNAIKLSEKEGNIFDIRDLYKRTLKNIDLLTYSFPCQDL<br>SQQGIQKGMKRGSGTRSGLLWEIERALDSTEKNDLPKYLLMEN<br>VGALLHKKNEEELNQWKQKLESLGYQNSIEVLNAADFGSSQA<br>RRRVFMISTLNEFVELPKGDKKPKSIKKVLNKIVSEKDILNNLL<br>KYNLTEFKKTKSNINKASLIGYSKFNSEGYVYDPEFTGPTLTAS<br>GANSRIKIKDGSNIRKMNSDETFLYIGFDSQDGKRVNEIEFLTEN<br>QKIFVCGNSISVEVLEAIIDKIGGSGGKRPAATKKAGQAKKKKG<br>SYPYDVPDYA |
| ZF17-MQ1, а. к. | 162 | MAPKKKRKVGIHGVPAAGSSGSLEPGEKPYKCPECGKSFSQSG<br>DLRRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQSGDLRRHQRTHTGEKPY<br>KCPECGKSFSERSHLREHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSTTGNLT<br>VHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSHRTTLTNHQRTHTGEKPYKCP<br>ECGKSFSDSGNLRVHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQSSSLVRH<br>QRTHTGEKPTGKKTSASGSGGGSGGARDSKVENKTKKLRVFE<br>AFAGIGAQRKALEKVRKDEYEIVGLAEWYVPAIVMYQAIHNNF<br>HTKLEYKSVSREEMIDYLENKTLSWNSKNPVSNGYWKRKKDD<br>ELKIIYNAIKLSEKEGNIFDIRDLYKRTLKNIDLLTYSFPCQDLSQ<br>QGIQKGMKRGSGTRSGLLWEIERALDSTEKNDLPKYLLMENV<br>GALLHKKNEEELNQWKQKLESLGYQNSIEVLNAADFGSSQAR<br>RRVFMISTLNEFVELPKGDKKPKSIKKVLNKIVSEKDILNNLLK<br>YNLTEFKKTKSNINKASLIGYSKFNSEGYVYDPEFTGPTLTASG<br>ANSRIKIKDGSNIRKMNSDETFLYIGFDSQDGKRVNEIEFLTENQ<br>KIFVCGNSISVEVLEAIIDKIGGSGGKRPAATKKAGQAKKKKGS<br>YPYDVPDYA |
| ZF15-MQ1, а. к., без HA-метки | 163 | MAPKKKRKVGIHGVPAAGSSGSLEPGEKPYKCPECGKSFSTSG<br>ELVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSERSHLREHQRTHTGEKPY<br>KCPECGKSFSRNDTLTEHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSRADNL<br>TEHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSTSGSLVRHQRTHTGEKPYKC<br>PECGKSFSSPADLTRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSDSGNLRVH<br>QRTHTGEKPTGKKTSASGSGGGSGGARDSKVENKTKKLRVFE<br>AFAGIGAQRKALEKVRKDEYEIVGLAEWYVPAIVMYQAIHNNF |

| | | |
|---|---|---|
| | | HTKLEYKSVSREEMIDYLENKTLSWNSKNPVSNGYWKRKKDD<br>ELKIIYNAIKLSEKEGNIFDIRDLYKRTLKNIDLLTYSFPCQDLSQ<br>QGIQKGMKRGSGTRSGLLWEIERALDSTEKNDLPKYLLMENV<br>GALLHKKNEEELNQWKQKLESLGYQNSIEVLNAADFGSSQAR<br>RRVFMISTLNEFVELPKGDKKPKSIKKVLNKIVSEKDILNNLLK<br>YNLTEFKKTKSNINKASLIGYSKFNSEGYVYDPEFTGPTLTASG<br>ANSRIKIKDGSNIRKMNSDETFLYIGFDSQDGKRVNEIEFLTENQ<br>KIFVCGNSISVEVLEAIIDKIGGSGGKRPAATKKAGQAKKKKGS |
| ZF16-MQ1, а. к., без HA-метки | 164 | MAPKKKRKVGIHGVPAAGSSGSLEPGEKPYKCPECGKSFSRSD<br>KLVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQRANLRAHQRTHTGEKP<br>YKCPECGKSFSRADNLTEHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQSSSL<br>VRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSDKKDLTRHQRTHTGEKPYK<br>CPECGKSFSSPADLTRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQSGHLTE<br>HQRTHTGEKPTGKKTSASGSGGGSGGARDSKVENKTKKLRVF<br>EAFAGIGAQRKALEKVRKDEYEIVGLAEWYVPAIVMYQAIHN<br>NFHTKLEYKSVSREEMIDYLENKTLSWNSKNPVSNGYWKRKK<br>DDELKIIYNAIKLSEKEGNIFDIRDLYKRTLKNIDLLTYSFPCQDL<br>SQQGIQKGMKRGSGTRSGLLWEIERALDSTEKNDLPKYLLMEN<br>VGALLHKKNEEELNQWKQKLESLGYQNSIEVLNAADFGSSQA<br>RRRVFMISTLNEFVELPKGDKKPKSIKKVLNKIVSEKDILNNLL<br>KYNLTEFKKTKSNINKASLIGYSKFNSEGYVYDPEFTGPTLTAS<br>GANSRIKIKDGSNIRKMNSDETFLYIGFDSQDGKRVNEIEFLTEN<br>QKIFVCGNSISVEVLEAIIDKIGGSGGKRPAATKKAGQAKKKKG<br>S |
| ZF17-MQ1, а. к., без HA-метки | 165 | MAPKKKRKVGIHGVPAAGSSGSLEPGEKPYKCPECGKSFSQSG<br>DLRRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQSGDLRRHQRTHTGEKPY<br>KCPECGKSFSERSHLREHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSTTGNLT<br>VHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSHRTTLTNHQRTHTGEKPYKCP<br>ECGKSFSDSGNLRVHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQSSSLVRH<br>QRTHTGEKPTGKKTSASGSGGGSGGARDSKVENKTKKLRVFE<br>AFAGIGAQRKALEKVRKDEYEIVGLAEWYVPAIVMYQAIHNNF<br>HTKLEYKSVSREEMIDYLENKTLSWNSKNPVSNGYWKRKKDD<br>ELKIIYNAIKLSEKEGNIFDIRDLYKRTLKNIDLLTYSFPCQDLSQ<br>QGIQKGMKRGSGTRSGLLWEIERALDSTEKNDLPKYLLMENV<br>GALLHKKNEEELNQWKQKLESLGYQNSIEVLNAADFGSSQAR |

| | | |
|---|---|---|
| | | RRVFMISTLNEFVELPKGDKKPKSIKKVLNKIVSEKDILNNLLK<br>YNLTEFKKTKSNINKASLIGYSKFNSEGYVYDPEFTGPTLTASG<br>ANSRIKIKDGSNIRKMNSDETFLYIGFDSQDGKRVNEIEFLTENQ<br>KIFVCGNSISVEVLEAIIDKIGGSGGKRPAATKKAGQAKKKKGS |

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение предусматривает систему репрессоров экспрессии, содержащую первую нацеливающуюся функциональную группу, содержащую первый ZF, первую эффекторную функциональную группу, содержащую ДНК-метилтрансферазу, например MQ1 или ее функциональный фрагмент, вторую нацеливающуюся функциональную группу, содержащую второй ZF, и вторую эффекторную функциональную группу, содержащую KRAB, например домен KRAB. В некоторых вариантах осуществления система репрессоров экспрессии кодируется первой нуклеиновой кислотой, кодирующей первую нацеливающуюся функциональную группу и первую эффекторную функциональную группу, где экспрессия управляется первым промотором или IRES, и второй нуклеиновой кислотой, кодирующей вторую нацеливающуюся функциональную группу и вторую эффекторную функциональную группу, где экспрессия управляется вторым промотором или IRES. В некоторых вариантах осуществления применяют моноцистронные последовательности. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота, кодирующая систему репрессора экспрессии, представляет собой мультицистронную последовательность. В некоторых вариантах осуществления мультицистронная последовательность представляет собой бицистронную последовательность. В некоторых вариантах осуществления мультицистронная последовательность содержит последовательность, кодирующую первый репрессор экспрессии, и последовательность, кодирующую второй репрессор экспрессии. В некоторых вариантах осуществления мультицистронная последовательность кодирует саморасщепляющуюся пептидную последовательность, например пептидную последовательность 2A, например пептидную последовательность T2A, последовательность P2A. В некоторых вариантах осуществления мультицистронная последовательность кодирует пептидную последовательность T2A и пептидную последовательность P2A. В некоторых вариантах осуществления мультицистронная последовательность кодирует последовательность тандема 2A, например последовательность tPT2A. В некоторых вариантах осуществления мультицистронная конструкция кодирует от 5' к 3' (i) первый сигнал ядерной локализации, например NLS SV40, (ii) первую нацеливающуюся функциональную группу, например ДНК-связывающий домен, например связывающийся домен по типу "цинкового пальца", например ZF-9, (iii) первую эффекторную функциональную группу, например ДНК-метилтрансферазу, например MQ1, (iv) второй сигнал ядерной локализации, например нуклеоплазмин NLS, (v) линкер, например линкер tPT2A, (vi) третий сигнал ядерной локализации, например NLS SV40, (vii) вторую нацеливающуюся функциональную группу, например ДНК-связывающий домен, например связывающийся домен по типу

"цинкового пальца", например ZF-3, (viii) вторую эффекторную функциональную группу, например функциональную группу репрессора транскрипции, например KRAB, и (ix) четвертый сигнал ядерной локализации, например нуклеоплазмин NLS. В некоторых вариантах осуществления бицистронная конструкция дополнительно содержит поли-А-хвост. В некоторых вариантах осуществления при транскрипции бицистронной генной конструкции продуцируется единый транскрипт mRNA, кодирующий первый репрессор экспрессии и второй репрессор экспрессии, который при трансляции расщепляется, например, после остатка глицина в пептиде 2A, с получением первого репрессора экспрессии и второго репрессора экспрессии в виде двух отдельных белков. В некоторых вариантах осуществления первый и второй репрессор экспрессии разделены "пропускаемой рибосомами последовательностью". В некоторых вариантах осуществления первый репрессор экспрессии и/или второй репрессор экспрессии сохраняет фрагмент пептида 2A после пропускаемой рибосомами последовательности. В некоторых вариантах осуществления уровни экспрессии первого и второго репрессора экспрессии равны. В некоторых вариантах осуществления уровни экспрессии первого и второго репрессора экспрессии отличаются. В некоторых вариантах осуществления уровень белка первого репрессора экспрессии в пределах 1%, 2%, 5% или 10% (больше или меньше) уровня белка второго репрессора экспрессии.

В некоторых вариантах осуществления система, кодируемая бицистронной нуклеиновой кислотой, снижает экспрессию гена-мишени (например, MYC) на по меньшей мере 1%, на по меньшей мере 2%, на по меньшей мере 3%, на по меньшей мере 4%, на по меньшей мере 5%, на по меньшей мере 10%, на по меньшей мере 20%, на по меньшей мере 30%, на по меньшей мере 40%, на по меньшей мере 50% в клетке, чем во всем остальном схожая система, в которой первый и второй репрессоры экспрессии кодируются моноцистронными нуклеиновыми кислотами.

В некоторых вариантах осуществления бицистронная последовательность кодирует аминокислоту под SEQ ID NO: 91, 92, 121, 122, 181, 182, 187, 188 или последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 99 или 100% идентичностью с ней или имеет не более чем 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 положение, отличающееся от нее. В некоторых вариантах осуществления система репрессора экспрессии содержит нацеливающуюся функциональную группу, содержащую домен по типу "Zn-пальца" (например, содержащий аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO:7 или 13), и эффекторную функциональную группу, содержащую MQ1, например бактериальную MQ1 (например, SEQ ID NO: 19), или KRAB, например домен KRAB (например, SEQ ID NO: 18). В некоторых вариантах осуществления репрессор экспрессии содержит аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 91, 92, 121, 122, 181, 182, 187, 188. Белковая последовательность данных иллюстративных систем репрессоров экспрессии раскрыта в таблице 10. В некоторых вариантах осуществления система репрессоров экспрессии, описанная в данном документе, содержит аминокислотную

последовательность под SEQ ID NO: 91-92, 121-122, 181, 182, 187, 188 или последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 99 или 100% идентичностью с ней или имеет не более чем 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 положение, отличающееся от нее.

В некоторых вариантах осуществления бицистронная последовательность содержит последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 93 или 112 (например, нуклеиновая кислота (например, cDNA), кодирующая репрессор экспрессии) или SEQ ID NO: 94 или 113 (например, нуклеиновая кислота (например, cDNA), кодирующая репрессор экспрессии). В некоторых вариантах осуществления бицистронная последовательность содержит последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 196 (например, нуклеиновая кислота (например, cDNA), кодирующая репрессор экспрессии) или SEQ ID NO: 197 (например, нуклеиновая кислота (например, cDNA), кодирующая репрессор экспрессии). В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота, описанная в данном документе, содержит последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 93, 94, 112, 113, 196 или 197 или последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 99 или 100% идентичностью с ней или имеет не более чем 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 положение, отличающееся от нее. Последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие данные иллюстративные системы репрессоров экспрессии, раскрыты в таблице 10. В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты содержит поли-А-последовательность, а в других вариантах осуществления, нуклеиновая кислота не содержит поли-А-последовательность.

Таблица 10. Аминокислотные последовательности и последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие иллюстративные системы репрессоров экспрессии

| Название | SEQ ID NO: | ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ |
|---|---|---|
| ZF9-MQ1+ZF3-KRAB (а. к.) | 91 | MAPKKKRKVGIHGVPAAGSSGSLEPGEKPYKCPECGKSFS<br>RSDDLVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSREDNLHTHQRTH<br>TGEKPYKCPECGKSFSRSDHLTTHQRTHTGEKPYKCPECGK<br>SFSQRANLRAHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQLAHLRAHQ<br>RTHTGEKPYKCPECGKSFSQRANLRAHQRTHTGEKPYKCP<br>ECGKSFSERSHLREHQRTHTGEKPTGKKTSASGSGGGSGG<br>ARDSKVENKTKKLRVFEAFAGIGAQRKALEKVRKDEYEIV<br>GLAEWYVPAIVMYQAIHNNFHTKLEYKSVSREEMIDYLEN<br>KTLSWNSKNPVSNGYWKRKKDDELKIIYNAIKLSEKEGNIF<br>DIRDLYKRTLKNIDLLTYSFPCQDLSQQGIQKGMKRGSGTR<br>SGLLWEIERALDSTEKNDLPKYLLMENVGALLHKKNEEEL |

| | | |
|---|---|---|
| | | NQWKQKLESLGYQNSIEVLNAADFGSSQARRRVFMISTLN<br>EFVELPKGDKKPKSIKKVLNKIVSEKDILNNLLKYNLTEFK<br>KTKSNINKASLIGYSKFNSEGYVYDPEFTGPTLTASGANSRI<br>KIKDGSNIRKMNSDETFLYIGFDSQDGKRVNEIEFLTENQKI<br>FVCGNSISVEVLEAIIDKIGGPSSGGKRPAATKKAGQAKKK<br>KGSYPYDVPDYAGSYPYDVPDYAATNFSLLKQAGDVEENP<br>GPTSAGKLGSGEGRGSLLTCGDVEENPGPLEGSSGSGSPKK<br>KRKVGIHGVPAAGSSGSLEPGEKPYKCPECGKSFSRSDKLV<br>RHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQRAHLERHQRTHTGEKPY<br>KCPECGKSFSDPGHLVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSRSD<br>KLVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQLAHLRAHQRTHTGE<br>KPYKCPECGKSFSRADNLTEHQRTHTGEKPYKCPECGKSFS<br>DCRDLARHQRTHTGEKPTGKKTSASGSGGGSGGDAKSLTA<br>WSRTLVTFKDVFVDFTREEWKLLDTAQQILYRNVMLENY<br>KNLVSLGYQLTKPDVILRLEKGEEPWLVEREIHQETHPDSE<br>TAFEIKSSVSGGKRPAATKKAGQAKKKKGSYPYDVPDYA*<br>SSGGKRPAATKKAGQAKKKKGSYPYDVPDYA |
| ZF3-<br>KRAB+ZF9-<br>MQ1 (а. к.) | 92 | MAPKKKRKVGIHGVPAAGSSGSLEPGEKPYKCPECGKSFS<br>RSDKLVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQRAHLERHQRTH<br>TGEKPYKCPECGKSFSDPGHLVRHQRTHTGEKPYKCPECG<br>KSFSRSDKLVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQLAHLRAH<br>QRTHTGEKPYKCPECGKSFSRADNLTEHQRTHTGEKPYKC<br>PECGKSFSDCRDLARHQRTHTGEKPTGKKTSASGSGGGSG<br>GDAKSLTAWSRTLVTFKDVFVDFTREEWKLLDTAQQILYR<br>NVMLENYKNLVSLGYQLTKPDVILRLEKGEEPWLVEREIH<br>QETHPDSETAFEIKSSVSSGGKRPAATKKAGQAKKKKGSYP<br>YDVPDYAGSYPYDVPDYAATNFSLLKQAGDVEENPGPTSA<br>GKLGSGEGRGSLLTCGDVEENPGPLEGSSGSGSPKKKRKV<br>GIHGVPAAGSSGSLEPGEKPYKCPECGKSFSRSDDLVRHQR<br>THTGEKPYKCPECGKSFSREDNLHTHQRTHTGEKPYKCPE<br>CGKSFSRSDHLTTHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQRANLRA<br>HQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQLAHLRAHQRTHTGEKPYK<br>CPECGKSFSQRANLRAHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSERSH<br>LREHQRTHTGEKPTGKKTSASGSGGGSGGARDSKVENKTK<br>KLRVFEAFAGIGAQRKALEKVRKDEYEIVGLAEWYVPAIV |

| | | |
|---|---|---|
| | | MYQAIHNNFHTKLEYKSVSREEMIDYLENKTLSWNSKNPV<br>SNGYWKRKKDDELKIIYNAIKLSEKEGNIFDIRDLYKRTLK<br>NIDLLTYSFPCQDLSQQGIQKGMKRGSGTRSGLLWEIERAL<br>DSTEKNDLPKYLLMENVGALLHKKNEEELNQWKQKLESL<br>GYQNSIEVLNAADFGSSQARRRVFMISTLNEFVELPKGDKK<br>PKSIKKVLNKIVSEKDILNNLLKYNLTEFKKTKSNINKASLI<br>GYSKFNSEGYVYDPEFTGPTLTASGANSRIKIKDGSNIRKM<br>NSDETFLYIGFDSQDGKRVNEIEFLTENQKIFVCGNSISVEV<br>LEAIIDKIGGPSGGKRPAATKKAGQAKKKKGSYPYDVPDY<br>A*SSGGKRPAATKKAGQAKKKKGSYPYDVPDYA |
| ZF9-MQ1+ZF3-KRAB (нт) | 93 | GCGGCAAATCCTTTTCTAGAAGCGATCATCTGACCACCC<br>ACCAAAGAACACATACCGGCGAGAAGCCTTACAAATGT<br>CCCGAGTGCGGAAAGTCCTTCTCCCAGAGAGCCAATCTG<br>AGGGCTCATCAAAGGACCCATACCGGCGAAAAGCCCTA<br>CAAATGCCCCGAGTGCGGAAAATCCTTCAGCCAGCTGGC<br>CCATCTGAGAGCCCACCAAAGGACACACACCGGAGAGA<br>AACCCTATAAGTGCCCCGAGTGTGGAAAAAGCTTTTCCC<br>AGAGGGCCAATCTGAGGGCCCATCAGAGGACCCATACC<br>GGAGAGAAGCCTTATAAATGTCCCGAGTGCGGAAAAAG<br>CTTCAGCGAGAGGAGCCATCTGAGGGAACATCAAAGAA<br>CCCACACCGGCGAAAAACCCACCGGAAAAAAGACCAGC<br>GCTAGCGGCAGCGGCGGCGGCAGCGGCGGCGCCCGGGA<br>CAGCAAGGTGGAGAACAAGACCAAGAAGCTGCGGGTGT<br>TCGAGGCCTTCGCCGGCATCGGCGCCCAGCGGAAGGCCC<br>TGGAGAAGGTGCGGAAGGACGAGTACGAGATCGTGGGC<br>CTGGCCGAGTGGTACGTGCCCGCCATCGTGATGTACCAG<br>GCCATCCACAACAACTTCCACACCAAGCTGGAGTACAAG<br>AGCGTGAGCCGGGAGGAGATGATCGACTACCTGGAGAA<br>CAAGACCCTGAGCTGGAACAGCAAGAACCCCGTGAGCA<br>ACGGCTACTGGAAGCGGAAGAAGGACGACGAGCTGAAG<br>ATCATCTACAACGCCATCAAGCTGAGCGAGAAGGAGGG<br>CAACATCTTCGACATCCGGGACCTGTACAAGCGGACCCT<br>GAAGAACATCGACCTGCTGACCTACAGCTTCCCCTGCCA<br>GGACCTGAGCCAGCAGGGCATCCAGAAGGGCATGAAGC<br>GGGGCAGCGGCACCCGGAGCGGCCTGCTGTGGGAGATC |

| | | |
|---|---|---|
| | | GAGCGGGCCCTGGACAGCACCGAGAAGAACGACCTGCC<br>CAAGTACCTGCTGATGGAGAACGTGGGCGCCCTGCTGCA<br>CAAGAAGAACGAGGAGGAGCTGAACCAGTGGAAGCAG<br>AAGCTGGAGAGCCTGGGCTACCAGAACAGCATCGAGGT<br>GCTGAACGCCGCCGACTTCGGCAGCAGCCAGGCCCGGC<br>GGCGGGTGTTCATGATCAGCACCCTGAACGAGTTCGTGG<br>AGCTGCCCAAGGGCGACAAGAAGCCCAAGAGCATCAAG<br>AAGGTGCTGAACAAGATCGTGAGCGAGAAGGACATCCT<br>GAACAACCTGCTGAAGTACAACCTGACCGAGTTCAAGA<br>AaACCAAGAGCAACATCAACAAGGCCAGCCTGATCGGCT<br>ACAGCAAGTTCAACAGCGAGGGCTACGTGTACGACCCC<br>GAGTTCACCGGCCCCACCCTGACCGCCAGCGGCGCCAAC<br>AGCCGGATCAAGATCAAGGACGGCAGCAACATCCGGAA<br>GATGAACAGCGACGAGACCTTCCTGTACATCGGCTTCGA<br>CAGCCAGGACGGCAAGCGGGTGAACGAGATCGAGTTCC<br>TGACCGAGAACCAGAAGATCTTCGTGTGCGGCAACAGC<br>ATCAGCGTGGAGGTGCTGGAGGCCATCATCGACAAGAT<br>CGGCGGCCCCAGCAGCGGCGGCAAGCGGCCCGCCGCCA<br>CCAAGAAGGCCGGCCAGGCCAAGAAGAAGAAGGGCAG<br>CTACCCCTACGACGTGCCCGACTACGCCGGGTCCTACCC<br>GTACGACGTGCCCGATTACGCCGCCACCAACTTCTCGCT<br>GCTGAAGCAGGCCGGAGATGTGGAAGAAAACCCTGGAC<br>CTACCAGTGCCGGAAAGCTCGGTAGCGGAGAGGGTCGG<br>GGAAGCCTGCTTACTTGCGGCGACGTGGAAGAGAACCC<br>CGGTCCGCTGGAGGGTTCGTCCGGCTCCGGATCCCCCAA<br>GAAGAAGCGGAAGGTGGGCATCCACGGCGTGCCCGCCG<br>CCGGCAGCAGCGGATCCCTGGAGCCCGGCGAAAAACCT<br>TACAAGTGCCCCGAGTGCGGAAAGAGCTTCAGCAGAAG<br>CGACAAACTGGTGAGGCATCAAAGGACACATACCGGAG<br>AGAAGCCCTATAAGTGCCCCGAATGTGGCAAATCCTTTT<br>CCCAGAGGGCTCATCTGGAAAGACACCAGAGGACCCAT<br>ACCGGCGAAAAACCCTACAAATGTCCCGAGTGTGGAAA<br>GAGCTTTTCCGATCCCGGCCATCTGGTCAGACATCAGAG<br>GACACATACCGGCGAAAAGCCTTACAAGTGTCCCGAAT<br>GCGGAAAATCCTTCTCCAGAAGCGACAAGCTGGTGAGG |

| | | |
|---|---|---|
| | | CACCAAAGAACCCACACCGGCGAAAAACCCTATAAATG<br>CCCCGAGTGCGGCAAGTCCTTTAGCCAGCTGGCCCATCT<br>GAGAGCCCACCAGAGAACACACACCGGAGAGAAGCCTT<br>ATAAGTGTCCCGAGTGCGGAAAGTCCTTCTCTAGAGCCG<br>ACAATCTGACCGAACATCAAAGGACACACACCGGCGAG<br>AAACCTTATAAATGCCCCGAGTGCGGAAAAAGCTTTTCC<br>GACTGCAGAGATCTGGCTAGACACCAGAGAACCCACAC<br>CGGCGAGAAACCCACCGGCAAAAAGACCAGCGCTAGCG<br>GCAGCGGCGGCGGCAGCGGCGGCGACGCCAAGAGCCTG<br>ACCGCCTGGAGCCGGACCCTGGTGACCTTCAAGGACGTG<br>TTCGTGGACTTCACCCGGGAGGAGTGGAAGCTGCTGGAC<br>ACCGCCCAGCAGATCCTGTACCGGAACGTGATGCTGGAG<br>AACTACAAGAACCTGGTGAGCCTGGGCTACCAGCTGACC<br>AAGCCCGACGTGATCCTGCGGCTGGAGAAGGGCGAGGA<br>GCCCTGGCTGGTGGAGCGGGAGATCCACCAGGAGACCC<br>ACCCCGACAGCGAGACCGCCTTCGAGATCAAGAGCAGC<br>GTGAGCGGCGGCAAGCGGCCCGCCGCCACCAAGAAGGC<br>CGGCCAGGCCAAGAAGAAGAAGGGCAGCTACCCCTACG<br>ACGTGCCCGACTACGCCTGAAGCAGCGGCGGCAAGCGG<br>CCCGCCGCCACCAAGAAGGCCGGCCAGGCCAAGAAGAA<br>GAAGGGCAGCTACCCCTACGACGTGCCCGACTACGCCTG<br>AGCGGCCGCTTAATTAAGCTGCCTTCTGCGGGGCTTGCC<br>TTCTGGCCATGCCCTTCTTCTCTCCCTTGCACCTGTACCT<br>CTTGGTCTTTGAATAAAGCCTGAGTAGGAAGTCTAGAAA<br>AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA<br>AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA<br>AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA |
| ZF3-<br>KRAB+ZF9-<br>MQ1 (нт) | 94 | TATAAATGCCCCGAGTGCGGAAAAAGCTTTTCCGACTGC<br>AGAGATCTGGCTAGACACCAGAGAACCCACACCGGCGA<br>GAAACCCACCGGCAAAAAGACCAGCGCTAGCGGCAGCG<br>GCGGCGGCAGCGGCGGCGACGCCAAGAGCCTGACCGCC<br>TGGAGCCGGACCCTGGTGACCTTCAAGGACGTGTTCGTG<br>GACTTCACCCGGGAGGAGTGGAAGCTGCTGGACACCGC<br>CCAGCAGATCCTGTACCGGAACGTGATGCTGGAGAACTA<br>CAAGAACCTGGTGAGCCTGGGCTACCAGCTGACCAAGC |

| | | |
|---|---|---|
| | | CCGACGTGATCCTGCGGCTGGAGAAGGGCGAGGAGCCC<br>TGGCTGGTGGAGCGGGAGATCCACCAGGAGACCCACCC<br>CGACAGCGAGACCGCCTTCGAGATCAAGAGCAGCGTGA<br>GCAGCGGCGGCAAGCGGCCCGCCGCCACCAAGAAGGCC<br>GGCCAGGCCAAGAAGAAGAAGGGCAGCTACCCCTACGA<br>CGTGCCCGACTACGCCGGGTCCTACCCGTACGACGTGCC<br>CGATTACGCCGCCACCAACTTCTCGCTGCTGAAGCAGGC<br>CGGAGATGTGGAAGAAAACCCTGGACCTACCAGTGCCG<br>GAAAGCTCGGTAGCGGAGAGGGTCGGGGAAGCCTGCTT<br>ACTTGCGGCGACGTGGAAGAGAACCCCGGTCCGCTGGA<br>GGGTTCGTCCGGCTCCGGATCCCCCAAGAAGAAGCGGA<br>AGGTGGGCATCCACGGCGTGCCCGCCGCCGGCAGCAGC<br>GGATCCCTGGAGCCCGGCGAGAAACCTTACAAATGCCCC<br>GAGTGCGGCAAGAGCTTCAGCAGAAGCGACGATCTGGT<br>GAGGCACCAAAGAACCCACACCGGCGAAAAACCTTACA<br>AGTGTCCCGAATGCGGAAAGTCCTTCAGCAGAGAGGAC<br>AATCTGCACACCCACCAGAGAACACACACCGGAGAAAA<br>GCCTTACAAGTGCCCCGAATGCGGCAAATCCTTTTCTAG<br>AAGCGATCATCTGACCACCCACCAAAGAACACATACCG<br>GCGAGAAGCCTTACAAATGTCCCGAGTGCGGAAAGTCCT<br>TCTCCCAGAGAGCCAATCTGAGGGCTCATCAAAGGACCC<br>ATACCGGCGAAAAGCCCTACAAATGCCCCGAGTGCGGA<br>AAATCCTTCAGCCAGCTGGCCCATCTGAGAGCCCACCAA<br>AGGACACACACCGGAGAGAAACCCTATAAGTGCCCCGA<br>GTGTGGAAAAAGCTTTTCCCAGAGGGCCAATCTGAGGGC<br>CCATCAGAGGACCCATACCGGAGAGAAGCCTTATAAAT<br>GTCCCGAGTGCGGAAAAAGCTTCAGCGAGAGGAGCCAT<br>CTGAGGGAACATCAAAGAACCCACACCGGCGAAAAACC<br>CACCGGAAAAAAGACCAGCGCTAGCGGCAGCGGCGGCG<br>GCAGCGGCGGCGCCCGGGACAGCAAGGTGGAGAACAAG<br>ACCAAGAAGCTGCGGGTGTTCGAGGCCTTCGCCGGCATC<br>GGCGCCCAGCGGAAGGCCCTGGAGAAGGTGCGGAAGGA<br>CGAGTACGAGATCGTGGGCCTGGCCGAGTGGTACGTGCC<br>CGCCATCGTGATGTACCAGGCCATCCACAACAACTTCCA<br>CACCAAGCTGGAGTACAAGAGCGTGAGCCGGGAGGAGA |

| | | |
|---|---|---|
| | | TGATCGACTACCTGGAGAACAAGACCCTGAGCTGGAAC<br>AGCAAGAACCCCGTGAGCAACGGCTACTGGAAGCGGAA<br>GAAGGACGACGAGCTGAAGATCATCTACAACGCCATCA<br>AGCTGAGCGAGAAGGAGGGCAACATCTTCGACATCCGG<br>GACCTGTACAAGCGGACCCTGAAGAACATCGACCTGCTG<br>ACCTACAGCTTCCCCTGCCAGGACCTGAGCCAGCAGGGC<br>ATCCAGAAGGGCATGAAGCGGGGCAGCGGCACCCGGAG<br>CGGCCTGCTGTGGGAGATCGAGCGGGCCCTGGACAGCA<br>CCGAGAAGAACGACCTGCCCAAGTACCTGCTGATGGAG<br>AACGTGGGCGCCCTGCTGCACAAGAAGAACGAGGAGGA<br>GCTGAACCAGTGGAAGCAGAAGCTGGAGAGCCTGGGCT<br>ACCAGAACAGCATCGAGGTGCTGAACGCCGCCGACTTC<br>GGCAGCAGCCAGGCCCGGCGGCGGGTGTTCATGATCAG<br>CACCCTGAACGAGTTCGTGGAGCTGCCCAAGGGCGACA<br>AGAAGCCCAAGAGCATCAAGAAGGTGCTGAACAAGATC<br>GTGAGCGAGAAGGACATCCTGAACAACCTGCTGAAGTA<br>CAACCTGACCGAGTTCAAGAAAACCAAGAGCAACATCA<br>ACAAGGCCAGCCTGATCGGCTACAGCAAGTTCAACAGC<br>GAGGGCTACGTGTACGACCCCGAGTTCACCGGCCCCACC<br>CTGACCGCCAGCGGCGCCAACAGCCGGATCAAGATCAA<br>GGACGGCAGCAACATCCGGAAGATGAACAGCGACGAGA<br>CCTTCCTGTACATCGGCTTCGACAGCCAGGACGGCAAGC<br>GGGTGAACGAGATCGAGTTCCTGACCGAGAACCAGAAG<br>ATCTTCGTGTGCGGCAACAGCATCAGCGTGGAGGTGCTG<br>GAGGCCATCATCGACAAGATCGGCGGCCCCAGCGGCGG<br>CAAGCGGCCCGCCGCCACCAAGAAGGCCGGCCAGGCCA<br>AGAAGAAGAAGGGCAGCTACCCCTACGACGTGCCCGAC<br>TACGCCTGAAGCAGCGGCGGCAAGCGGCCCGCCGCCAC<br>CAAGAAGGCCGGCCAGGCCAAGAAGAAGAAGGGCAGCT<br>ACCCCTACGACGTGCCCGACTACGCCTGAGCGGCCGCTT<br>AATTAAGCTGCCTTCTGCGGGGCTTGCCTTCTGGCCATG<br>CCCTTCTTCTCTCCCTTGCACCTGTACCTCTTGGTCTTTGA<br>ATAAAGCCTGAGTAGGAAGTCTAGAAAAAAAAAAAAAAA<br>AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA<br>AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA |

| | | |
|---|---|---|
| | | AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA |
| Полная нуклеотидная последовательность ZF9-MQ1+ZF3-KRAB | 112 | AGGAAATAAGAGAGAAAAGAAGAGTAAGAAGAAATAT<br>AAGAGCCACCATGGCCCCCAAGAAGAAGCGGAAGGTGG<br>GCATCCACGGCGTGCCCGCCGCCGGCAGCAGCGGATCCC<br>TGGAGCCCGGCGAGAAACCTTACAAATGCCCCGAGTGC<br>GGCAAGAGCTTCAGCAGAAGCGACGATCTGGTGAGGCA<br>CCAAAGAACCCACACCGGCGAAAAACCTTACAAGTGTC<br>CCGAATGCGGAAAGTCCTTCAGCAGAGAGGACAATCTG<br>CACACCCACCAGAGAACACACACCGGAGAAAAGCCTTA<br>CAAGTGCCCCGAATGCGGCAAATCCTTTTCTAGAAGCGA<br>TCATCTGACCACCCACCAAAGAACACATACCGGCGAGA<br>AGCCTTACAAATGTCCCGAGTGCGGAAAGTCCTTCTCCC<br>AGAGAGCCAATCTGAGGGCTCATCAAAGGACCCATACC<br>GGCGAAAAGCCCTACAAATGCCCCGAGTGCGGAAAATC<br>CTTCAGCCAGCTGGCCCATCTGAGAGCCCACCAAAGGAC<br>ACACACCGGAGAGAAACCCTATAAGTGCCCCGAGTGTG<br>GAAAAAGCTTTTCCCAGAGGGCCAATCTGAGGGCCCATC<br>AGAGGACCCATACCGGAGAGAAGCCTTATAAATGTCCC<br>GAGTGCGGAAAAAGCTTCAGCGAGAGGAGCCATCTGAG<br>GGAACATCAAAGAACCCACACCGGCGAAAAACCCACCG<br>GAAAAAAGACCAGCGCTAGCGGCAGCGGCGGCGGCAGC<br>GGCGGCGCCCGGGACAGCAAGGTGGAGAACAAGACCAA<br>GAAGCTGCGGGTGTTCGAGGCCTTCGCCGGCATCGGCGC<br>CCAGCGGAAGGCCCTGGAGAAGGTGCGGAAGGACGAGT<br>ACGAGATCGTGGGCCTGGCCGAGTGGTACGTGCCCGCCA<br>TCGTGATGTACCAGGCCATCCACAACAACTTCCACACCA<br>AGCTGGAGTACAAGAGCGTGAGCCGGGAGGAGATGATC<br>GACTACCTGGAGAACAAGACCCTGAGCTGGAACAGCAA<br>GAACCCCGTGAGCAACGGCTACTGGAAGCGGAAGAAGG<br>ACGACGAGCTGAAGATCATCTACAACGCCATCAAGCTG<br>AGCGAGAAGGAGGGCAACATCTTCGACATCCGGGACCT<br>GTACAAGCGGACCCTGAAGAACATCGACCTGCTGACCTA<br>CAGCTTCCCCTGCCAGGACCTGAGCCAGCAGGGCATCCA<br>GAAGGGCATGAAGCGGGGCAGCGGCACCCGGAGCGGCC<br>TGCTGTGGGAGATCGAGCGGGCCCTGGACAGCACCGAG |

| | | |
|---|---|---|
| | | AAGAACGACCTGCCCAAGTACCTGCTGATGGAGAACGT<br>GGGCGCCCTGCTGCACAAGAAGAACGAGGAGGAGCTGA<br>ACCAGTGGAAGCAGAAGCTGGAGAGCCTGGGCTACCAG<br>AACAGCATCGAGGTGCTGAACGCCGCCGACTTCGGCAG<br>CAGCCAGGCCCGGCGGCGGGTGTTCATGATCAGCACCCT<br>GAACGAGTTCGTGGAGCTGCCCAAGGGCGACAAGAAGC<br>CCAAGAGCATCAAGAAGGTGCTGAACAAGATCGTGAGC<br>GAGAAGGACATCCTGAACAACCTGCTGAAGTACAACCT<br>GACCGAGTTCAAGAAaACCAAGAGCAACATCAACAAGG<br>CCAGCCTGATCGGCTACAGCAAGTTCAACAGCGAGGGCT<br>ACGTGTACGACCCCGAGTTCACCGGCCCCACCCTGACCG<br>CCAGCGGCGCCAACAGCCGGATCAAGATCAAGGACGGC<br>AGCAACATCCGGAAGATGAACAGCGACGAGACCTTCCT<br>GTACATCGGCTTCGACAGCCAGGACGGCAAGCGGGTGA<br>ACGAGATCGAGTTCCTGACCGAGAACCAGAAGATCTTCG<br>TGTGCGGCAACAGCATCAGCGTGGAGGTGCTGGAGGCC<br>ATCATCGACAAGATCGGCGGCCCCAGCAGCGGCGGCAA<br>GCGGCCCGCCGCCACCAAGAAGGCCGGCCAGGCCAAGA<br>AGAAGAAGGGCAGCTACCCCTACGACGTGCCCGACTAC<br>GCCGGGTCCTACCCGTACGACGTGCCCGATTACGCCGCC<br>ACCAACTTCTCGCTGCTGAAGCAGGCCGGAGATGTGGAA<br>GAAAACCCTGGACCTACCAGTGCCGGAAAGCTCGGTAG<br>CGGAGAGGGTCGGGGAAGCCTGCTTACTTGCGGCGACG<br>TGGAAGAGAACCCCGGTCCGCTGGAGGGTTCGTCCGGCT<br>CCGGATCCCCCAAGAAGAAGCGGAAGGTGGGCATCCAC<br>GGCGTGCCCGCCGCCGGCAGCAGCGGATCCCTGGAGCC<br>CGGCGAAAAACCTTACAAGTGCCCCGAGTGCGGAAAGA<br>GCTTCAGCAGAAGCGACAAACTGGTGAGGCATCAAAGG<br>ACACATACCGGAGAGAAGCCCTATAAGTGCCCCGAATG<br>TGGCAAATCCTTTTCCCAGAGGGCTCATCTGGAAAGACA<br>CCAGAGGACCCATACCGGCGAAAAACCCTACAAATGTC<br>CCGAGTGTGGAAAGAGCTTTTCCGATCCCGGCCATCTGG<br>TCAGACATCAGAGGACACATACCGGCGAAAAGCCTTAC<br>AAGTGTCCCGAATGCGGAAAATCCTTCTCCAGAAGCGAC<br>AAGCTGGTGAGGCACCAAAGAACCCACACCGGCGAAAA |

| | | |
|---|---|---|
| | | ACCCTATAAATGCCCCGAGTGCGGCAAGTCCTTTAGCCA<br>GCTGGCCCATCTGAGAGCCCACCAGAGAACACACACCG<br>GAGAGAAGCCTTATAAGTGTCCCGAGTGCGGAAAGTCCT<br>TCTCTAGAGCCGACAATCTGACCGAACATCAAAGGACAC<br>ACACCGGCGAGAAACCTTATAAATGCCCCGAGTGCGGA<br>AAAAGCTTTTCCGACTGCAGAGATCTGGCTAGACACCAG<br>AGAACCCACACCGGCGAGAAACCCACCGGCAAAAAGAC<br>CAGCGCTAGCGGCAGCGGCGGCGGCAGCGGCGGCGACG<br>CCAAGAGCCTGACCGCCTGGAGCCGGACCCTGGTGACCT<br>TCAAGGACGTGTTCGTGGACTTCACCCGGGAGGAGTGGA<br>AGCTGCTGGACACCGCCCAGCAGATCCTGTACCGGAACG<br>TGATGCTGGAGAACTACAAGAACCTGGTGAGCCTGGGCT<br>ACCAGCTGACCAAGCCCGACGTGATCCTGCGGCTGGAG<br>AAGGGCGAGGAGCCCTGGCTGGTGGAGCGGGAGATCCA<br>CCAGGAGACCCACCCCGACAGCGAGACCGCCTTCGAGA<br>TCAAGAGCAGCGTGAGCGGCGGCAAGCGGCCCGCCGCC<br>ACCAAGAAGGCCGGCCAGGCCAAGAAGAAGAAGGGCA<br>GCTACCCCTACGACGTGCCCGACTACGCCTGAAGCAGCG<br>GCGGCAAGCGGCCCGCCGCCACCAAGAAGGCCGGCCAG<br>GCCAAGAAGAAGAAGGGCAGCTACCCCTACGACGTGCC<br>CGACTACGCCTGAGCGGCCGCTTAATTAAGCTGCCTTCT<br>GCGGGGCTTGCCTTCTGGCCATGCCCTTCTTCTCTCCCTT<br>GCACCTGTACCTCTTGGTCTTTGAATAAAGCCTGAGTAG<br>GAAGTCTAGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA<br>AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA<br>AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA<br>AAAAAAAAAAAA |
| Полная нуклеотидная последовательность ZF3-KRAB+ZF9-MQ1 | 113 | AGGAAATAAGAGAGAAAAGAAGAGTAAGAAGAAATAT<br>AAGAGCCACCATGGCCCCCAAGAAGAAGCGGAAGGTGG<br>GCATCCACGGCGTGCCCGCCGCCGGCAGCAGCGGATCCC<br>TGGAGCCCGGCGAAAAACCTTACAAGTGCCCCGAGTGC<br>GGAAAGAGCTTCAGCAGAAGCGACAAACTGGTGAGGCA<br>TCAAAGGACACATACCGGAGAGAAGCCCTATAAGTGCC<br>CCGAATGTGGCAAATCCTTTTCCCAGAGGGCTCATCTGG<br>AAAGACACCAGAGGACCCATACCGGCGAAAAACCCTAC |

| | | |
|---|---|---|
| | | AAATGTCCCGAGTGTGGAAAGAGCTTTTCCGATCCCGGC<br>CATCTGGTCAGACATCAGAGGACACATACCGGCGAAAA<br>GCCTTACAAGTGTCCCGAATGCGGAAAATCCTTCTCCAG<br>AAGCGACAAGCTGGTGAGGCACCAAAGAACCCACACCG<br>GCGAAAAACCCTATAAATGCCCCGAGTGCGGCAAGTCCT<br>TTAGCCAGCTGGCCCATCTGAGAGCCCACCAGAGAACAC<br>ACACCGGAGAGAAGCCTTATAAGTGTCCCGAGTGCGGA<br>AAGTCCTTCTCTAGAGCCGACAATCTGACCGAACATCAA<br>AGGACACACACCGGCGAGAAACCTTATAAATGCCCCGA<br>GTGCGGAAAAAGCTTTTCCGACTGCAGAGATCTGGCTAG<br>ACACCAGAGAACCCACACCGGCGAGAAACCCACCGGCA<br>AAAAGACCAGCGCTAGCGGCAGCGGCGGCGGCAGCGGC<br>GGCGACGCCAAGAGCCTGACCGCCTGGAGCCGGACCCT<br>GGTGACCTTCAAGGACGTGTTCGTGGACTTCACCCGGGA<br>GGAGTGGAAGCTGCTGGACACCGCCCAGCAGATCCTGT<br>ACCGGAACGTGATGCTGGAGAACTACAAGAACCTGGTG<br>AGCCTGGGCTACCAGCTGACCAAGCCCGACGTGATCCTG<br>CGGCTGGAGAAGGGCGAGGAGCCCTGGCTGGTGGAGCG<br>GGAGATCCACCAGGAGACCCACCCCGACAGCGAGACCG<br>CCTTCGAGATCAAGAGCAGCGTGAGCAGCGGCGGCAAG<br>CGGCCCGCCGCCACCAAGAAGGCCGGCCAGGCCAAGAA<br>GAAGAAGGGCAGCTACCCCTACGACGTGCCCGACTACG<br>CCGGGTCCTACCCGTACGACGTGCCCGATTACGCCGCCA<br>CCAACTTCTCGCTGCTGAAGCAGGCCGGAGATGTGGAAG<br>AAAACCCTGGACCTACCAGTGCCGGAAAGCTCGGTAGC<br>GGAGAGGGTCGGGGAAGCCTGCTTACTTGCGGCGACGT<br>GGAAGAGAACCCCGGTCCGCTGGAGGGTTCGTCCGGCTC<br>CGGATCCCCCAAGAAGAAGCGGAAGGTGGGCATCCACG<br>GCGTGCCCGCCGCCGGCAGCAGCGGATCCCTGGAGCCC<br>GGCGAGAAACCTTACAAATGCCCCGAGTGCGGCAAGAG<br>CTTCAGCAGAAGCGACGATCTGGTGAGGCACCAAAGAA<br>CCCACACCGGCGAAAAACCTTACAAGTGTCCCGAATGCG<br>GAAAGTCCTTCAGCAGAGAGGACAATCTGCACACCCAC<br>CAGAGAACACACACCGGAGAAAAGCCTTACAAGTGCCC<br>CGAATGCGGCAAATCCTTTTCTAGAAGCGATCATCTGAC |

| | | |
|---|---|---|
| | | CACCCACCAAAGAACACATACCGGCGAGAAGCCTTACA<br>AATGTCCCGAGTGCGGAAAGTCCTTCTCCCAGAGAGCCA<br>ATCTGAGGGCTCATCAAAGGACCCATACCGGCGAAAAG<br>CCCTACAAATGCCCCGAGTGCGGAAAATCCTTCAGCCAG<br>CTGGCCCATCTGAGAGCCCACCAAAGGACACACACCGG<br>AGAGAAACCCTATAAGTGCCCCGAGTGTGGAAAAAGCT<br>TTTCCCAGAGGGCCAATCTGAGGGCCCATCAGAGGACCC<br>ATACCGGAGAGAAGCCTTATAAATGTCCCGAGTGCGGA<br>AAAAGCTTCAGCGAGAGGAGCCATCTGAGGGAACATCA<br>AAGAACCCACACCGGCGAAAAACCCACCGGAAAAAAGA<br>CCAGCGCTAGCGGCAGCGGCGGCGGCAGCGGCGGCGCC<br>CGGGACAGCAAGGTGGAGAACAAGACCAAGAAGCTGCG<br>GGTGTTCGAGGCCTTCGCCGGCATCGGCGCCCAGCGGAA<br>GGCCCTGGAGAAGGTGCGGAAGGACGAGTACGAGATCG<br>TGGGCCTGGCCGAGTGGTACGTGCCCGCCATCGTGATGT<br>ACCAGGCCATCCACAACAACTTCCACACCAAGCTGGAGT<br>ACAAGAGCGTGAGCCGGGAGGAGATGATCGACTACCTG<br>GAGAACAAGACCCTGAGCTGGAACAGCAAGAACCCCGT<br>GAGCAACGGCTACTGGAAGCGGAAGAAGGACGACGAGC<br>TGAAGATCATCTACAACGCCATCAAGCTGAGCGAGAAG<br>GAGGGCAACATCTTCGACATCCGGGACCTGTACAAGCG<br>GACCCTGAAGAACATCGACCTGCTGACCTACAGCTTCCC<br>CTGCCAGGACCTGAGCCAGCAGGGCATCCAGAAGGGCA<br>TGAAGCGGGGCAGCGGCACCCGGAGCGGCCTGCTGTGG<br>GAGATCGAGCGGGCCCTGGACAGCACCGAGAAGAACGA<br>CCTGCCCAAGTACCTGCTGATGGAGAACGTGGGCGCCCT<br>GCTGCACAAGAAGAACGAGGAGGAGCTGAACCAGTGGA<br>AGCAGAAGCTGGAGAGCCTGGGCTACCAGAACAGCATC<br>GAGGTGCTGAACGCCGCCGACTTCGGCAGCAGCCAGGC<br>CCGGCGGCGGGTGTTCATGATCAGCACCCTGAACGAGTT<br>CGTGGAGCTGCCCAAGGGCGACAAGAAGCCCAAGAGCA<br>TCAAGAAGGTGCTGAACAAGATCGTGAGCGAGAAGGAC<br>ATCCTGAACAACCTGCTGAAGTACAACCTGACCGAGTTC<br>AAGAAAACCAAGAGCAACATCAACAAGGCCAGCCTGAT<br>CGGCTACAGCAAGTTCAACAGCGAGGGCTACGTGTACG |

| | | |
|---|---|---|
| | | ACCCCGAGTTCACCGGCCCCACCCTGACCGCCAGCGGCG<br>CCAACAGCCGGATCAAGATCAAGGACGGCAGCAACATC<br>CGGAAGATGAACAGCGACGAGACCTTCCTGTACATCGG<br>CTTCGACAGCCAGGACGGCAAGCGGGTGAACGAGATCG<br>AGTTCCTGACCGAGAACCAGAAGATCTTCGTGTGCGGCA<br>ACAGCATCAGCGTGGAGGTGCTGGAGGCCATCATCGAC<br>AAGATCGGCGGCCCCAGCGGCGGCAAGCGGCCCGCCGC<br>CACCAAGAAGGCCGGCCAGGCCAAGAAGAAGAAGGGC<br>AGCTACCCCTACGACGTGCCCGACTACGCCTGAAGCAGC<br>GGCGGCAAGCGGCCCGCCGCCACCAAGAAGGCCGGCCA<br>GGCCAAGAAGAAGAAGGGCAGCTACCCCTACGACGTGC<br>CCGACTACGCCTGAGCGGCCGCTTAATTAAGCTGCCTTC<br>TGCGGGGCTTGCCTTCTGGCCATGCCCTTCTTCTCTCCCT<br>TGCACCTGTACCTCTTGGTCTTTGAATAAAGCCTGAGTA<br>GGAAGTCTAGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA<br>AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA<br>AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA<br>AAAAAAAAAAAA |
| ZF09-MQ1-tPT2A-ZF54-KRAB, нт | 196 | GGGAAATAAGAGAGAAAAGAAGAGTAAGAAGAAATAT<br>AAGAGCCACCATGGCCCCAAAGAAGAAGAGAAAGGTCG<br>GAATTCATGGCGTGCCCGCAGCCGGCAGCAGCGGTTCCC<br>TGGAGCCCGGCGAGAAACCTTACAAATGCCCCGAGTGC<br>GGCAAGAGCTTCAGCAGAAGCGACGATCTGGTGAGGCA<br>CCAAAGAACCCACACCGGCGAAAAACCTTACAAGTGTC<br>CCGAATGCGGAAAGTCCTTCAGCAGAGAGGACAATCTG<br>CACACCCACCAGAGAACACACACCGGAGAAAAGCCTTA<br>CAAGTGCCCCGAATGCGGCAAATCCTTTTCTAGAAGCGA<br>TCATCTGACCACCCACCAAAGAACACATACCGGCGAGA<br>AGCCTTACAAATGTCCCGAGTGCGGAAAGTCCTTCTCCC<br>AGAGAGCCAATCTGAGGGCTCATCAAAGGACCCATACC<br>GGCGAAAAGCCCTACAAATGCCCCGAGTGCGGAAAATC<br>CTTCAGCCAGCTGGCCCATCTGAGAGCCCACCAAAGGAC<br>ACACACCGGAGAGAAACCCTATAAGTGCCCCGAGTGTG<br>GAAAAAGCTTTTCCCAGAGGGCCAATCTGAGGGCCCATC<br>AGAGGACCCATACCGGAGAGAAGCCTTATAAATGTCCC |

| | | |
|---|---|---|
| | | GAGTGCGGAAAAAGCTTCAGCGAGAGGAGCCATCTGAG<br>GGAACATCAAAGAACCCACACCGGCGAAAAACCCACCG<br>GAAAAAAGACCAGCGCTAGCGGCAGCGGCGGCGGCAGC<br>GGCGGCGCCCGGGACAGCAAGGTGGAGAACAAGACCAA<br>GAAGCTGCGGGTGTTCGAGGCCTTCGCCGGCATCGGCGC<br>CCAGCGGAAGGCCCTGGAGAAGGTGCGGAAGGACGAGT<br>ACGAGATCGTGGGCCTGGCCGAGTGGTACGTGCCCGCCA<br>TCGTGATGTACCAGGCCATCCACAACAACTTCCACACCA<br>AGCTGGAGTACAAGAGCGTGAGCCGGGAGGAGATGATC<br>GACTACCTGGAGAACAAGACCCTGAGCTGGAACAGCAA<br>GAACCCCGTGAGCAACGGCTACTGGAAGCGGAAGAAGG<br>ACGACGAGCTGAAGATCATCTACAACGCCATCAAGCTG<br>AGCGAGAAGGAGGGCAACATCTTCGACATCCGGGACCT<br>GTACAAGCGGACCCTGAAGAACATCGACCTGCTGACCTA<br>CAGCTTCCCCTGCCAGGACCTGAGCCAGCAGGGCATCCA<br>GAAGGGCATGAAGCGGGGCAGCGGCACCCGGAGCGGCC<br>TGCTGTGGGAGATCGAGCGGGCCCTGGACAGCACCGAG<br>AAGAACGACCTGCCCAAGTACCTGCTGATGGAGAACGT<br>GGGCGCCCTGCTGCACAAGAAGAACGAGGAGGAGCTGA<br>ACCAGTGGAAGCAGAAGCTGGAGAGCCTGGGCTACCAG<br>AACAGCATCGAGGTGCTGAACGCCGCCGACTTCGGCAG<br>CAGCCAGGCCCGGCGGCGGGTGTTCATGATCAGCACCCT<br>GAACGAGTTCGTGGAGCTGCCCAAGGGCGACAAGAAGC<br>CCAAGAGCATCAAGAAGGTGCTGAACAAGATCGTGAGC<br>GAGAAGGACATCCTGAACAACCTGCTGAAGTACAACCT<br>GACCGAGTTCAAGAAAACCAAGAGCAACATCAACAAGG<br>CCAGCCTGATCGGCTACAGCAAGTTCAACAGCGAGGGCT<br>ACGTGTACGACCCCGAGTTCACCGGCCCCACCCTGACCG<br>CCAGCGGCGCCAACAGCCGGATCAAGATCAAGGACGGC<br>AGCAACATCCGGAAGATGAACAGCGACGAGACCTTCCT<br>GTACATCGGCTTCGACAGCCAGGACGGCAAGCGGGTGA<br>ACGAGATCGAGTTCCTGACCGAGAACCAGAAGATCTTCG<br>TGTGCGGCAACAGCATCAGCGTGGAGGTGCTGGAGGCC<br>ATCATCGACAAGATCGGCGGCCCCAGCGGCGGCAAGCG<br>GCCCGCCGCCACCAAGAAGGCCGGCCAGGCCAAGAAGA |

| | | |
|---|---|---|
| | | AGAAGGGCAGCTACCCCTACGACGTGCCCGACTACGCC<br>GGGTCCGCCACCAACTTCTCGCTGCTGAAGCAGGCCGGA<br>GACGTGGAAGAAAACCCTGGACCTACCAGTGCCGGAAA<br>GCTCGGTAGCGGAGAGGGTCGGGGAAGCCTGCTTACTTG<br>CGGCGACGTGGAAGAGAACCCCGGTCCGCTGGAGGGTT<br>CGTCCGGCTCCGGATCCCCCAAGAAGAAGCGGAAGGTG<br>GGCATCCACGGCGTGCCCGCCGCCGGCAGCAGCGGATC<br>CCTGGAGCCTGGAGAGAAACCCTACAAATGCCCGGAAT<br>GCGGGAAGTCCTTTTCCGAACGCTCGCACCTGAGGGAAC<br>ACCAGAGAACTCACACCGGCGAAAAACCCTATAAGTGC<br>CCAGAATGCGGAAAGAGCTTTTCACGGTCGGACAACCTC<br>GTGCGGCACCAACGCACTCATACCGGAGAGAAGCCGTA<br>CAAGTGTCCTGAGTGCGGAAAGTCATTCTCCGACTGCCG<br>GGATTTGGCCCGCCACCAAAGAACACACACTGGCGAAA<br>AGCCCTACAAGTGCCCGGAGTGTGGAAAGTCCTTCAGCA<br>CTTCCGGAGAGCTGGTCCGGCACCAGAGGACCCACACC<br>GGGGAGAAGCCTTACAAATGTCCAGAGTGCGGTAAAAG<br>CTTCTCCACCACCGGCAACCTCACCGTGCACCAGCGGAC<br>CCACACTGGAGAAAAGCCGTATAAATGCCCCGAATGCG<br>GCAAGAGCTTCTCGCGATCCGATAAGCTTGTGCGGCATC<br>AGAGAACGCACACTGGGGAAAAGCCTTATAAGTGTCCG<br>GAGTGCGGCAAATCCTTCTCCCGCACTGACACCCTGCGG<br>GACCATCAGCGCACCCATACCGGCAAAAAGACCTCTGCT<br>AGCGGCAGCGGCGGCGGCAGCGGCGGCGCCCGGGACGA<br>CGCCAAGAGCCTGACCGCCTGGAGCCGGACCCTGGTGA<br>CCTTCAAGGACGTGTTCGTGGACTTCACCCGGGAGGAGT<br>GGAAGCTGCTGGACACCGCCCAGCAGATCCTGTACCGG<br>AACGTGATGCTGGAGAACTACAAGAACCTGGTGAGCCT<br>GGGCTACCAGCTGACCAAGCCCGACGTGATCCTGCGGCT<br>GGAGAAGGGCGAGGAGCCCTGGCTGGTGGAGCGGGAGA<br>TCCACCAGGAAACCCACCCCGACAGCGAAACCGCCTTCG<br>AGATCAAGAGCAGCGTGCCCAGCAGCGGCGGCAAGCGG<br>CCCGCCGCCACCAAGAAGGCCGGCCAGGCCAAGAAGAA<br>GAAGGGCAGCTACCCCTACGACGTGCCCGACTACGCCTG<br>AGCGGCCGCTTAATTAAGCTGCCTTCTGCGGGGCTTGCC |

| | | |
|---|---|---|
| | | TTCTGGCCATGCCCTTCTTCTCTCCCTTGCACCTGTACCT<br>CTTGGTCTTTGAATAAAGCCTGAGTAGGAAGTCTAGAAA<br>AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA<br>AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA<br>AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA |
| ZF54-KRAB-tPT2A-ZF09-MQ1, нт | 197 | GGGAAATAAGAGAGAAAAGAAGAGTAAGAAGAAATAT<br>AAGAGCCACCATGGCCCCAAAGAAGAAGAGAAAGGTCG<br>GAATTCATGGCGTGCCCGCAGCCGGCAGCAGCGGTTCCC<br>TGGAGCCTGGAGAGAAACCCTACAAATGCCCGGAATGC<br>GGGAAGTCCTTTTCCGAACGCTCGCACCTGAGGGAACAC<br>CAGAGAACTCACACCGGCGAAAAACCCTATAAGTGCCC<br>AGAATGCGGAAAGAGCTTTTCACGGTCGGACAACCTCGT<br>GCGGCACCAACGCACTCATACCGGAGAGAAGCCGTACA<br>AGTGTCCTGAGTGCGGAAAGTCATTCTCCGACTGCCGGG<br>ATTTGGCCCGCCACCAAAGAACACACACTGGCGAAAAG<br>CCCTACAAGTGCCCGGAGTGTGGAAAGTCCTTCAGCACT<br>TCCGGAGAGCTGGTCCGGCACCAGAGGACCCACACCGG<br>GGAGAAGCCTTACAAATGTCCAGAGTGCGGTAAAAGCT<br>TCTCCACCACCGGCAACCTCACCGTGCACCAGCGGACCC<br>ACACTGGAGAAAAGCCGTATAAATGCCCCGAATGCGGC<br>AAGAGCTTCTCGCGATCCGATAAGCTTGTGCGGCATCAG<br>AGAACGCACACTGGGGAAAAGCCTTATAAGTGTCCGGA<br>GTGCGGCAAATCCTTCTCCCGCACTGACACCCTGCGGGA<br>CCATCAGCGCACCCATACCGGCAAAAAGACCTCTGCTAG<br>CGGCAGCGGCGGCGGCAGCGGCGGCGCCCGGGACGACG<br>CCAAGAGCCTGACCGCCTGGAGCCGGACCCTGGTGACCT<br>TCAAGGACGTGTTCGTGGACTTCACCCGGGAGGAGTGGA<br>AGCTGCTGGACACCGCCCAGCAGATCCTGTACCGGAACG<br>TGATGCTGGAGAACTACAAGAACCTGGTGAGCCTGGGCT<br>ACCAGCTGACCAAGCCCGACGTGATCCTGCGGCTGGAG<br>AAGGGCGAGGAGCCCTGGCTGGTGGAGCGGGAGATCCA<br>CCAGGAAACCCACCCCGACAGCGAAACCGCCTTCGAGA<br>TCAAGAGCAGCGTGCCCAGCAGCGGCGGCAAGCGGCCC<br>GCCGCCACCAAGAAGGCCGGCCAGGCCAAGAAGAAGAA<br>GGGCAGCTACCCCTACGACGTGCCCGACTACGCCGGGTC |

| | | |
|---|---|---|
| | | CGCCACCAACTTCTCGCTGCTGAAGCAGGCCGGAGACGT<br>GGAAGAAAACCCTGGACCTACCAGTGCCGGAAAGCTCG<br>GTAGCGGAGAGGGTCGGGGAAGCCTGCTTACTTGCGGC<br>GACGTGGAAGAGAACCCCGGTCCGCTGGAGGGTTCGTC<br>CGGCTCCGGATCCCCCAAGAAGAAGCGGAAGGTGGGCA<br>TCCACGGCGTGCCCGCCGCCGGCAGCAGCGGATCCCTGG<br>AGCCCGGCGAGAAACCTTACAAATGCCCCGAGTGCGGC<br>AAGAGCTTCAGCAGAAGCGACGATCTGGTGAGGCACCA<br>AAGAACCCACACCGGCGAAAAACCTTACAAGTGTCCCG<br>AATGCGGAAAGTCCTTCAGCAGAGAGGACAATCTGCAC<br>ACCCACCAGAGAACACACACCGGAGAAAAGCCTTACAA<br>GTGCCCCGAATGCGGCAAATCCTTTTCTAGAAGCGATCA<br>TCTGACCACCCACCAAAGAACACATACCGGCGAGAAGC<br>CTTACAAATGTCCCGAGTGCGGAAAGTCCTTCTCCCAGA<br>GAGCCAATCTGAGGGCTCATCAAAGGACCCATACCGGC<br>GAAAAGCCCTACAAATGCCCCGAGTGCGGAAAATCCTTC<br>AGCCAGCTGGCCCATCTGAGAGCCCACCAAAGGACACA<br>CACCGGAGAGAAACCCTATAAGTGCCCCGAGTGTGGAA<br>AAAGCTTTTCCCAGAGGGCCAATCTGAGGGCCCATCAGA<br>GGACCCATACCGGAGAGAAGCCTTATAAATGTCCCGAGT<br>GCGGAAAAAGCTTCAGCGAGAGGAGCCATCTGAGGGAA<br>CATCAAAGAACCCACACCGGCGAAAAACCCACCGGAAA<br>AAAGACCAGCGCTAGCGGCAGCGGCGGCGGCAGCGGCG<br>GCGCCCGGGACAGCAAGGTGGAGAACAAGACCAAGAAG<br>CTGCGGGTGTTCGAGGCCTTCGCCGGCATCGGCGCCCAG<br>CGGAAGGCCCTGGAGAAGGTGCGGAAGGACGAGTACGA<br>GATCGTGGGCCTGGCCGAGTGGTACGTGCCCGCCATCGT<br>GATGTACCAGGCCATCCACAACAACTTCCACACCAAGCT<br>GGAGTACAAGAGCGTGAGCCGGGAGGAGATGATCGACT<br>ACCTGGAGAACAAGACCCTGAGCTGGAACAGCAAGAAC<br>CCCGTGAGCAACGGCTACTGGAAGCGGAAGAAGGACGA<br>CGAGCTGAAGATCATCTACAACGCCATCAAGCTGAGCG<br>AGAAGGAGGGCAACATCTTCGACATCCGGGACCTGTAC<br>AAGCGGACCCTGAAGAACATCGACCTGCTGACCTACAG<br>CTTCCCCTGCCAGGACCTGAGCCAGCAGGGCATCCAGAA |

| | | |
|---|---|---|
| | | GGGCATGAAGCGGGGCAGCGGCACCCGGAGCGGCCTGC<br>TGTGGGAGATCGAGCGGGCCCTGGACAGCACCGAGAAG<br>AACGACCTGCCCAAGTACCTGCTGATGGAGAACGTGGG<br>CGCCCTGCTGCACAAGAAGAACGAGGAGGAGCTGAACC<br>AGTGGAAGCAGAAGCTGGAGAGCCTGGGCTACCAGAAC<br>AGCATCGAGGTGCTGAACGCCGCCGACTTCGGCAGCAG<br>CCAGGCCCGGCGGCGGGTGTTCATGATCAGCACCCTGAA<br>CGAGTTCGTGGAGCTGCCCAAGGGCGACAAGAAGCCCA<br>AGAGCATCAAGAAGGTGCTGAACAAGATCGTGAGCGAG<br>AAGGACATCCTGAACAACCTGCTGAAGTACAACCTGACC<br>GAGTTCAAGAAAACCAAGAGCAACATCAACAAGGCCAG<br>CCTGATCGGCTACAGCAAGTTCAACAGCGAGGGCTACGT<br>GTACGACCCCGAGTTCACCGGCCCCACCCTGACCGCCAG<br>CGGCGCCAACAGCCGGATCAAGATCAAGGACGGCAGCA<br>ACATCCGGAAGATGAACAGCGACGAGACCTTCCTGTAC<br>ATCGGCTTCGACAGCCAGGACGGCAAGCGGGTGAACGA<br>GATCGAGTTCCTGACCGAGAACCAGAAGATCTTCGTGTG<br>CGGCAACAGCATCAGCGTGGAGGTGCTGGAGGCCATCA<br>TCGACAAGATCGGCGGCCCCAGCGGCGGCAAGCGGCCC<br>GCCGCCACCAAGAAGGCCGGCCAGGCCAAGAAGAAGAA<br>GGGCAGCTACCCCTACGACGTGCCCGACTACGCCTGAGC<br>GGCCGCTTAATTAAGCTGCCTTCTGCGGGGCTTGCCTTCT<br>GGCCATGCCCTTCTTCTCTCCCTTGCACCTGTACCTCTTG<br>GTCTTTGAATAAAGCCTGAGTAGGAAGTCTAGAAAAAA<br>AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA<br>AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA<br>AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA |
| ZF9-MQ1+ZF3-KRAB (а. к.) | 121 | MAPKKKRKVGIHGVPAAGSSGSLEPGEKPYKCPECGKSFS<br>RSDDLVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSREDNLHTHQRTH<br>TGEKPYKCPECGKSFSRSDHLTTHQRTHTGEKPYKCPECGK<br>SFSQRANLRAHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQLAHLRAHQ<br>RTHTGEKPYKCPECGKSFSQRANLRAHQRTHTGEKPYKCP<br>ECGKSFSERSHLREHQRTHTGEKPTGKKTSASGSGGGSGG<br>ARDSKVENKTKKLRVFEAFAGIGAQRKALEKVRKDEYEIV<br>GLAEWYVPAIVMYQAIHNNFHTKLEYKSVSREEMIDYLEN |

| | | |
|---|---|---|
| | | KTLSWNSKNPVSNGYWKRKKDDELKIIYNAIKLSEKEGNIF<br>DIRDLYKRTLKNIDLLTYSFPCQDLSQQGIQKGMKRGSGTR<br>SGLLWEIERALDSTEKNDLPKYLLMENVGALLHKKNEEEL<br>NQWKQKLESLGYQNSIEVLNAADFGSSQARRRVFMISTLN<br>EFVELPKGDKKPKSIKKVLNKIVSEKDILNNLLKYNLTEFK<br>KTKSNINKASLIGYSKFNSEGYVYDPEFTGPTLTASGANSRI<br>KIKDGSNIRKMNSDETFLYIGFDSQDGKRVNEIEFLTENQKI<br>FVCGNSISVEVLEAIIDKIGGPSSGGKRPAATKKAGQAKKK<br>KGSYPYDVPDYAGSYPYDVPDYAATNFSLLKQAGDVEENP<br>GPTSAGKLGSGEGRGSLLTCGDVEENPGPLEGSSGSGSPKK<br>KRKVGIHGVPAAGSSGSLEPGEKPYKCPECGKSFSRSDKLV<br>RHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQRAHLERHQRTHTGEKPY<br>KCPECGKSFSDPGHLVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSRSD<br>KLVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQLAHLRAHQRTHTGE<br>KPYKCPECGKSFSRADNLTEHQRTHTGEKPYKCPECGKSFS<br>DCRDLARHQRTHTGEKPTGKKTSASGSGGGSGGDAKSLTA<br>WSRTLVTFKDVFVDFTREEWKLLDTAQQILYRNVMLENY<br>KNLVSLGYQLTKPDVILRLEKGEEPWLVEREIHQETHPDSE<br>TAFEIKSSVSGGKRPAATKKAGQAKKKKGSYPYDVPDYA |
| ZF3-<br>KRAB+ZF9-<br>MQ1(a. к.) | 122 | MAPKKKRKVGIHGVPAAGSSGSLEPGEKPYKCPECGKSFS<br>RSDKLVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQRAHLERHQRTH<br>TGEKPYKCPECGKSFSDPGHLVRHQRTHTGEKPYKCPECG<br>KSFSRSDKLVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQLAHLRAH<br>QRTHTGEKPYKCPECGKSFSRADNLTEHQRTHTGEKPYKC<br>PECGKSFSDCRDLARHQRTHTGEKPTGKKTSASGSGGGSG<br>GDAKSLTAWSRTLVTFKDVFVDFTREEWKLLDTAQQILYR<br>NVMLENYKNLVSLGYQLTKPDVILRLEKGEEPWLVEREIH<br>QETHPDSETAFEIKSSVSSGGKRPAATKKAGQAKKKKGSYP<br>YDVPDYAGSYPYDVPDYAATNFSLLKQAGDVEENPGPTSA<br>GKLGSGEGRGSLLTCGDVEENPGPLEGSSGSGSPKKKRKV<br>GIHGVPAAGSSGSLEPGEKPYKCPECGKSFSRSDDLVRHQR<br>THTGEKPYKCPECGKSFSREDNLHTHQRTHTGEKPYKCPE<br>CGKSFSRSDHLTTHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQRANLRA<br>HQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQLAHLRAHQRTHTGEKPYK<br>CPECGKSFSQRANLRAHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSERSH |

| | | |
|---|---|---|
| | | LREHQRTHTGEKPTGKKTSASGSGGGSGGARDSKVENKTK<br>KLRVFEAFAGIGAQRKALEKVRKDEYEIVGLAEWYVPAIV<br>MYQAIHNNFHTKLEYKSVSREEMIDYLENKTLSWNSKNPV<br>SNGYWKRKKDDELKIIYNAIKLSEKEGNIFDIRDLYKRTLK<br>NIDLLTYSFPCQDLSQQGIQKGMKRGSGTRSGLLWEIERAL<br>DSTEKNDLPKYLLMENVGALLHKKNEEELNQWKQKLESL<br>GYQNSIEVLNAADFGSSQARRRVFMISTLNEFVELPKGDKK<br>PKSIKKVLNKIVSEKDILNNLLKYNLTEFKKTKSNINKASLI<br>GYSKFNSEGYVYDPEFTGPTLTASGANSRIKIKDGSNIRKM<br>NSDETFLYIGFDSQDGKRVNEIEFLTENQKIFVCGNSISVEV<br>LEAIIDKIGGPSGGKRPAATKKAGQAKKKKGSYPYDVPDY<br>A |
| ZF09-MQ1-tPT2A-ZF54-KRAB, а. к. | 181 | MAPKKKRKVGIHGVPAAGSSGSLEPGEKPYKCPECGKSFS<br>RSDDLVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSREDNLHTHQRTH<br>TGEKPYKCPECGKSFSRSDHLTTHQRTHTGEKPYKCPECGK<br>SFSQRANLRAHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQLAHLRAHQ<br>RTHTGEKPYKCPECGKSFSQRANLRAHQRTHTGEKPYKCP<br>ECGKSFSERSHLREHQRTHTGEKPTGKKTSASGSGGGSGG<br>ARDSKVENKTKKLRVFEAFAGIGAQRKALEKVRKDEYEIV<br>GLAEWYVPAIVMYQAIHNNFHTKLEYKSVSREEMIDYLEN<br>KTLSWNSKNPVSNGYWKRKKDDELKIIYNAIKLSEKEGNIF<br>DIRDLYKRTLKNIDLLTYSFPCQDLSQQGIQKGMKRGSGTR<br>SGLLWEIERALDSTEKNDLPKYLLMENVGALLHKKNEEEL<br>NQWKQKLESLGYQNSIEVLNAADFGSSQARRRVFMISTLN<br>EFVELPKGDKKPKSIKKVLNKIVSEKDILNNLLKYNLTEFK<br>KTKSNINKASLIGYSKFNSEGYVYDPEFTGPTLTASGANSRI<br>KIKDGSNIRKMNSDETFLYIGFDSQDGKRVNEIEFLTENQKI<br>FVCGNSISVEVLEAIIDKIGGPSGGKRPAATKKAGQAKKKK<br>GSYPYDVPDYAGSATNFSLLKQAGDVEENPGPTSAGKLGS<br>GEGRGSLLTCGDVEENPGPLEGSSGSGSPKKKRKVGIHGVP<br>AAGSSGSLEPGEKPYKCPECGKSFSERSHLREHQRTHTGEK<br>PYKCPECGKSFSRSDNLVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSD<br>CRDLARHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSTSGELVRHQRTHT<br>GEKPYKCPECGKSFSTTGNLTVHQRTHTGEKPYKCPECGK<br>SFSRSDKLVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSRTDTLRDHQR |

| | | |
|---|---|---|
| | | THTGKKTSASGSGGGSGGARDDAKSLTAWSRTLVTFKDVF<br>VDFTREEWKLLDTAQQILYRNVMLENYKNLVSLGYQLTKP<br>DVILRLEKGEEPWLVEREIHQETHPDSETAFEIKSSVPSSGG<br>KRPAATKKAGQAKKKKGSYPYDVPDYA |
| ZF54-KRAB-tPT2A-ZF09-MQ1, а. к. | 182 | MAPKKKRKVGIHGVPAAGSSGSLEPGEKPYKCPECGKSFSE<br>RSHLREHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSRSDNLVRHQRTHT<br>GEKPYKCPECGKSFSDCRDLARHQRTHTGEKPYKCPECGK<br>SFSTSGELVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSTTGNLTVHQR<br>THTGEKPYKCPECGKSFSRSDKLVRHQRTHTGEKPYKCPE<br>CGKSFSRTDTLRDHQRTHTGKKTSASGSGGGSGGARDDAK<br>SLTAWSRTLVTFKDVFVDFTREEWKLLDTAQQILYRNVML<br>ENYKNLVSLGYQLTKPDVILRLEKGEEPWLVEREIHQETHP<br>DSETAFEIKSSVPSSGGKRPAATKKAGQAKKKKGSYPYDV<br>PDYAGSATNFSLLKQAGDVEENPGPTSAGKLGSGEGRGSL<br>LTCGDVEENPGPLEGSSGSGSPKKKRKVGIHGVPAAGSSGS<br>LEPGEKPYKCPECGKSFSRSDDLVRHQRTHTGEKPYKCPEC<br>GKSFSREDNLHTHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSRSDHLTTH<br>QRTHTGEKPYKCPECGKSFSQRANLRAHQRTHTGEKPYKC<br>PECGKSFSQLAHLRAHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQRAN<br>LRAHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSERSHLREHQRTHTGEKP<br>TGKKTSASGSGGGSGGARDSKVENKTKKLRVFEAFAGIGA<br>QRKALEKVRKDEYEIVGLAEWYVPAIVMYQAIHNNFHTKL<br>EYKSVSREEMIDYLENKTLSWNSKNPVSNGYWKRKKDDE<br>LKIIYNAIKLSEKEGNIFDIRDLYKRTLKNIDLLTYSFPCQDL<br>SQQGIQKGMKRGSGTRSGLLWEIERALDSTEKNDLPKYLL<br>MENVGALLHKKNEEELNQWKQKLESLGYQNSIEVLNAAD<br>FGSSQARRRVFMISTLNEFVELPKGDKKPKSIKKVLNKIVSE<br>KDILNNLLKYNLTEFKKTKSNINKASLIGYSKFNSEGYVYD<br>PEFTGPTLTASGANSRIKIKDGSNIRKMNSDETFLYIGFDSQ<br>DGKRVNEIEFLTENQKIFVCGNSISVEVLEAIIDKIGGPSGGK<br>RPAATKKAGQAKKKKGSYPYDVPDYA |
| ZF09-MQ1-tPT2A-ZF54-KRAB, а. к., без HA-метки | 187 | MAPKKKRKVGIHGVPAAGSSGSLEPGEKPYKCPECGKSFS<br>RSDDLVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSREDNLHTHQRTH<br>TGEKPYKCPECGKSFSRSDHLTTHQRTHTGEKPYKCPECGK<br>SFSQRANLRAHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQLAHLRAHQ |

| | | |
|---|---|---|
| | | RTHTGEKPYKCPECGKSFSQRANLRAHQRTHTGEKPYKCP<br>ECGKSFSERSHLREHQRTHTGEKPTGKKTSASGSGGGSGG<br>ARDSKVENKTKKLRVFEAFAGIGAQRKALEKVRKDEYEIV<br>GLAEWYVPAIVMYQAIHNNFHTKLEYKSVSREEMIDYLEN<br>KTLSWNSKNPVSNGYWKRKKDDELKIIYNAIKLSEKEGNIF<br>DIRDLYKRTLKNIDLLTYSFPCQDLSQQGIQKGMKRGSGTR<br>SGLLWEIERALDSTEKNDLPKYLLMENVGALLHKKNEEEL<br>NQWKQKLESLGYQNSIEVLNAADFGSSQARRRVFMISTLN<br>EFVELPKGDKKPKSIKKVLNKIVSEKDILNNLLKYNLTEFK<br>KTKSNINKASLIGYSKFNSEGYVYDPEFTGPTLTASGANSRI<br>KIKDGSNIRKMNSDETFLYIGFDSQDGKRVNEIEFLTENQKI<br>FVCGNSISVEVLEAIIDKIGGPSGGKRPAATKKAGQAKKKK<br>GSYPYDVPDYAGSATNFSLLKQAGDVEENPGPTSAGKLGS<br>GEGRGSLLTCGDVEENPGPLEGSSGSGSPKKKRKVGIHGVP<br>AAGSSGSLEPGEKPYKCPECGKSFSERSHLREHQRTHTGEK<br>PYKCPECGKSFSRSDNLVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSD<br>CRDLARHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSTSGELVRHQRTHT<br>GEKPYKCPECGKSFSTTGNLTVHQRTHTGEKPYKCPECGK<br>SFSRSDKLVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSRTDTLRDHQR<br>THTGKKTSASGSGGGSGGARDDAKSLTAWSRTLVTFKDVF<br>VDFTREEWKLLDTAQQILYRNVMLENYKNLVSLGYQLTKP<br>DVILRLEKGEEPWLVEREIHQETHPDSETAFEIKSSVPSSGG<br>KRPAATKKAGQAKKKKGS |
| ZF54-KRAB-tPT2A-ZF09-MQ1, а. к., без HA-метки | 188 | MAPKKKRKVGIHGVPAAGSSGSLEPGEKPYKCPECGKSFSE<br>RSHLREHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSRSDNLVRHQRTHT<br>GEKPYKCPECGKSFSDCRDLARHQRTHTGEKPYKCPECGK<br>SFSTSGELVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSTTGNLTVHQR<br>THTGEKPYKCPECGKSFSRSDKLVRHQRTHTGEKPYKCPE<br>CGKSFSRTDTLRDHQRTHTGKKTSASGSGGGSGGARDDAK<br>SLTAWSRTLVTFKDVFVDFTREEWKLLDTAQQILYRNVML<br>ENYKNLVSLGYQLTKPDVILRLEKGEEPWLVEREIHQETHP<br>DSETAFEIKSSVPSSGGKRPAATKKAGQAKKKKGSYPYDV<br>PDYAGSATNFSLLKQAGDVEENPGPTSAGKLGSGEGRGSL<br>LTCGDVEENPGPLEGSSGSGSPKKKRKVGIHGVPAAGSSGS<br>LEPGEKPYKCPECGKSFSRSDDLVRHQRTHTGEKPYKCPEC |

| | | |
|---|---|---|
| | | GKSFSREDNLHTHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSRSDHLTTH<br>QRTHTGEKPYKCPECGKSFSQRANLRAHQRTHTGEKPYKC<br>PECGKSFSQLAHLRAHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQRAN<br>LRAHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSERSHLREHQRTHTGEKP<br>TGKKTSASGSGGGSGGARDSKVENKTKKLRVFEAFAGIGA<br>QRKALEKVRKDEYEIVGLAEWYVPAIVMYQAIHNNFHTKL<br>EYKSVSREEMIDYLENKTLSWNSKNPVSNGYWKRKKDDE<br>LKIIYNAIKLSEKEGNIFDIRDLYKRTLKNIDLLTYSFPCQDL<br>SQQGIQKGMKRGSGTRSGLLWEIERALDSTEKNDLPKYLL<br>MENVGALLHKKNEEELNQWKQKLESLGYQNSIEVLNAAD<br>FGSSQARRRVFMISTLNEFVELPKGDKKPKSIKKVLNKIVSE<br>KDILNNLLKYNLTEFKKTKSNINKASLIGYSKFNSEGYVYD<br>PEFTGPTLTASGANSRIKIKDGSNIRKMNSDETFLYIGFDSQ<br>DGKRVNEIEFLTENQKIFVCGNSISVEVLEAIIDKIGGPSGGK<br>RPAATKKAGQAKKKKGS |

В некоторых вариантах осуществления репрессор экспрессии содержит последовательность ядерной локализации (NLS). В некоторых вариантах осуществления репрессор экспрессии содержит NLS, например NLS SV40 на N-конце. В некоторых вариантах осуществления репрессор экспрессии содержит NLS, например NLS нуклеоплазмина на C-конце. В некоторых вариантах осуществления репрессор экспрессии содержит первую NLS на N-конце и вторую NLS на C-конце. В некоторых вариантах осуществления первая и вторая NLS имеют одинаковую последовательность. В некоторых вариантах осуществления первая и вторая NLS имеют отличающиеся последовательности. В некоторых вариантах осуществления репрессор экспрессии содержит NLS SV40, например репрессор экспрессии содержит последовательность в соответствии с PKKKRK (SEQ ID NO: 135). В некоторых вариантах осуществления N-концевая последовательность содержит NLS и спейсер, например, содержащий последовательность согласно: MAPKKKRKVGIHGVPAAGSSGS (SEQ ID NO: 88). В некоторых вариантах осуществления репрессор экспрессии содержит C-концевую последовательность, содержащую одну или несколько из, например, любых двух или всех трех из следующих: спейсер, последовательность ядерной локализации нуклеоплазмина, и HA-метку: например, SGGKRPAATKKAGQAKKKGSYPYDVPDYA (SEQ ID NO: 89). В некоторых вариантах осуществления репрессор экспрессии содержит эпитопную метку, например HA-метку: YPYDVPDYA (SEQ ID NO: 90). Например, репрессор экспрессии может содержать две копии эпитопной метки.

Хотя эпитопная метка полезна во многих исследовательских контекстах, иногда необходимо исключить эпитопную метку в терапевтическом контексте. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления у репрессора экспрессии отсутствует эпитопная

метка. В некоторых вариантах осуществления репрессор экспрессии, описанный в данном документе, содержит последовательность, приведенную в данном документе (или последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 99 или 100% идентичностью с ней или имеет не более чем 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 положение, отличающееся от нее), но с отсутствующей HA-меткой под SEQ ID NO: 90. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота, описанная в данном документе, содержит последовательность, приведенную в данном документе (или последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 99 или 100% идентичностью с ней или имеет не более чем 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 положение, отличающееся от нее), но с отсутствующей областью, кодирующей HA-метку, под SEQ ID NO: 90. В некоторых вариантах осуществления репрессор экспрессии содержит NLS нуклеоплазмина, например репрессор экспрессии содержит последовательность KRPAATKKAGQAKKK (SEQ ID NO: 136). В некоторых вариантах осуществления репрессор экспрессии не содержит NLS. В некоторых вариантах осуществления репрессор экспрессии не содержит эпитопную метку. В некоторых вариантах осуществления репрессор экспрессии не содержит HA-метку. В некоторых вариантах осуществления репрессор экспрессии не содержит последовательность HA-метки в соответствии с SEQ ID NO: 90.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение предусматривает систему репрессоров экспрессии, содержащую саморасщепляющийся пептид. Саморасщепляющиеся пептиды, впервые обнаруженные у пикорнавирусов, представляют собой пептиды длиной от 19 до 22 аминокислот и обычно находятся между двумя белками у некоторых представителей семейства пикорнавирусов. С помощью саморасщепляющихся белков пикорнавирусы способны продуцировать эквимолярные уровни нескольких генов с одной и той же mRNA. Известно, что такие саморасщепляющиеся белки обнаруживаются и у других видов вирусов, и специалист в данной области на основе представленной в данном документе информации при необходимости сможет легко определить подходящую замену для саморасщепляющегося белка, раскрытого в данном документе. В некоторых вариантах осуществления система репрессоров экспрессии содержит саморасщепляющийся пептид, например саморасщепляющийся пептид 2A. В некоторых вариантах осуществления пептид 2A содержит один сайт расщепления, например пептид 2A, например пептид P2A, T2A, E2A или F2A. В некоторых вариантах осуществления саморасщепляющийся пептид, например пептид 2A, содержит два сайта расщепления, например pPT2A или P2A-T2A-E2A. В некоторых вариантах осуществления система репрессоров экспрессии содержит саморасщепляющийся пептид, содержащий множество сайтов расщепления, например саморасщепляющийся пептид T2A и саморасщепляющийся пептид P2A. В некоторых вариантах осуществления пептид 2A расщепляется после трансляции. В некоторых вариантах осуществления саморасщепляющийся пептид после расщепления дает два или более фрагментов. В некоторых вариантах осуществления пептидные фрагменты 2A

содержат последовательности под SEQ ID NO: 126-128. В некоторых вариантах осуществления саморасщепляющийся пептид 2A содержит последовательность под SEQ ID NO: 120, 124, 125 или ее производную. В некоторых вариантах осуществления SEQ ID NO: 95 содержит последовательность саморасщепляющегося пептида.

PSSGGKRPAATKKAGQAKKKKGSYPYDVPDYAGSYPYDVPDYAATNFSLLKQA GDVEENPGPTSAGKLGSGEGRGSLLTCGDVEENPGPLEGSSGSGSPKKKRKVGIHGVPA AGSSGS (SEQ ID NO: 95);

EGRGSLLTCGDVEENPGP (SEQ ID NO: 120);

ATNFSLLKQAGDVEENPGPTSAGKLGSGEGRGSLLTCGDVEENPGP (SEQ ID NO: 124);

ATNFSLLKQAGDVEENPGP (SEQ ID NO:125);

ATNFSLLKQAGDVEENPG (SEQ ID NO: 126);

PTSAGKLGSGEGRGSLLTCGDVEENPG (SEQ ID NO: 127);

P (SEQ ID NO: 128).

Разумеется, понятно, что хотя последовательность 2A, например последовательность tPT2A (например, в соответствии с SEQ ID NO: 124), может быть упомянута в научной литературе и в данном документе как саморасщепляющийся пептид, это соответствует неограничивающей теории. Согласно другой неограничивающей теории, в некоторых вариантах осуществления последовательность 2A играет роль пропускаемой рибосомами последовательности. Например, mRNA, кодирующая последовательность 2A, может индуцировать пропуск рибосомами, когда рибосома не может образовать пептидную связь при трансляции области 2A, что приводит в результате к высвобождению первой части продукта трансляции. Затем рибосома продуцирует вторую часть продукта трансляции. В целом хорошо установлено, что последовательность 2A, помещенная между первой последовательностью и второй последовательностью, приведет к продуцированию первого белка, содержащего первую последовательность, и отдельного второго белка, содержащего вторую последовательность. Настоящее изобретение не связано какой-либо конкретной теорией относительно молекулярного механизма, с помощью которого достигается данный результат.

Функциональные характеристики

Репрессор экспрессии или систему по настоящему изобретению можно применять для снижения уровня экспрессии гена-мишени, например MYC, в клетке. Как правило, репрессор экспрессии или система, которые описаны в данном документе, связывает (например, посредством нацеливающейся функциональной группы) элемент геномной последовательности, проксимальной по отношению к гену-мишени и/или функционально связанной с ним, например MYC. В некоторых вариантах осуществления связывание репрессора экспрессии или системы с элементом геномной последовательности модулирует (например, снижает) уровень экспрессии гена-мишени, например MYC. Например, связывание репрессора экспрессии или системы, которые содержат эффекторную функциональную группу, которая подавляет рекрутинг компонентов

механизма транскрипции с элементом геномной последовательности, может модулировать (например, снижать) уровень экспрессии гена-мишени, например MYC. В качестве дополнительного примера связывание репрессора экспрессии или системы, которые содержат эффекторную функциональную группу с ферментативной активностью (например, эпигенетической модифицирующей функциональной группы), может модулировать (например, снижать) уровень экспрессии гена-мишени (например, MYC) посредством локализованной ферментативной активности эффекторной функциональной группы. В качестве дополнительного примера как связывание репрессора экспрессии или системы с элементом геномной последовательности, так и локализованная ферментативная активность репрессора экспрессии или системы могут способствовать возникающей в результате модуляции (например, снижению) уровня экспрессии гена-мишени, например MYC.

В некоторых вариантах осуществления снижение уровня экспрессии предусматривает снижение уровня РНК, например mRNA, кодируемой геном-мишенью, например MYC. В некоторых вариантах осуществления снижение уровня экспрессии предусматривает снижение уровня белка, кодируемого геном-мишенью, например MYC. В некоторых вариантах осуществления снижение уровня экспрессии предусматривает снижение уровня как mRNA, так и белка, кодируемых геном-мишенью, например MYC. В некоторых вариантах осуществления экспрессия гена-мишени в клетке, находящейся в контакте с репрессором экспрессии или системой репрессии экспрессии, которые описаны в данном документе, или содержащей их, по меньшей мере в 1,05x (т. е. в 1,05 раза) 1,1x, 1,15x, 1,2x, 1,25x, 1,3x, 1,35x, 1,4x, 1,45x, 1,5x, 1,55x, 1,6x, 1,65x, 1,7x, 1,75x, 1,8x, 1,85x, 1,9x, 1,95x, 2x, 3x, 4x, 5x, 6x, 7x, 8x, 9x, 10x, 20x, 30x, 40x, 50x, 60x, 70x, 80x, 90x, или 100x ниже, чем уровень экспрессии гена-мишени в клетке, не контактирующей с репрессором экспрессии или системой репрессии экспрессии, которые раскрыты в данном документе, или не содержащей их. Экспрессию гена-мишени, например MYC, можно оценить с помощью способов, известных специалистам в данной области, в том числе RT-PCR, ELISA, вестерн-блоттинга и способов из примеров 2-9. Уровень экспрессии гена-мишени, например MYC, у субъекта, например пациента, например пациента с нарушением, представляющим собой неправильную регуляцию MYC, например пациента с заболеванием печени, пациента с неоплазией и/или вирусным или связанным с алкоголем заболеванием печени, например у пациента с гепатокарциномой, например у пациента с гепатокарциномой подтипа S1 или гепатокарциномой подтипа S2, можно оценить путем оценки уровней в крови (например, в цельной крови) гена-мишени, например MYC, например, способом согласно либо Oglesbee et al. Clin Chem. 2013 Oct;59(10):1461-9. Doi: 10.1373/clinchem.2013.207472, либо Deutsch et al. J Neurol Neurosurg Psychiatry. 2014 Sep;85(9):994-1002. Doi: 10.1136/jnnp-2013-306788, содержание которых включено в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

Репрессор экспрессии или систему по настоящему изобретению можно применять для снижения уровня экспрессии гена-мишени, например MYC, в клетке на некоторый

период времени. В некоторых вариантах осуществления экспрессия гена-мишени, например MYC, в клетке, находящейся в контакте с репрессором экспрессии или системой или содержащей их, заметно снижается на период, составляющий по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 или 24 часа, или не менее 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 10, 14 или 15 дней, или не менее 1, 2, 3, 4 или 5 недель, или не менее 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 месяцев, или по меньшей мере 1, 2, 3, 4 года или 5 лет (например, на неопределенный срок). Необязательно, экспрессия гена-мишени, например MYC, в клетке, находящейся в контакте с репрессором экспрессии или системой или содержащей их, заметно снижается на период не более чем 10, 9, 8, 7, 6, 5 лет, 4, 3, 2 года или 1 год. В некоторых вариантах осуществления уровень экспрессии гена-мишени, например MYC, в клетке, находящейся в контакте с репрессором экспрессии или системой или содержащей их, в значительной степени снижается в течение по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 клеточных делений. Репрессор экспрессии или систему по настоящему изобретению можно применять для метилирования нуклеотидов CpG в промоторе-мишени, например промоторе MYC. В некоторых вариантах осуществления транскрипционные изменения экспрессии MYC коррелируют с процентом метилирования CpG. В некоторых вариантах осуществления метилирование сохраняется в течение по меньшей мере 1 дня, по меньшей мере 2 дней, по меньшей мере 5 дней, по меньшей мере 7 дней, по меньшей мере 10 дней, по меньшей мере 15 дней или по меньшей мере 20 дней после обработки с помощью репрессора экспрессии или системы, раскрытых в данном документе.

Репрессор экспрессии или систему по настоящему изобретению можно применять для снижения жизнеспособности клетки, содержащей локус-мишень, например локус MYC. В некоторых вариантах осуществления репрессор экспрессии или систему по настоящему изобретению можно применять для снижения жизнеспособности множества клеток, содержащих локус-мишень, например локус MYC. В некоторых вариантах осуществления количество жизнеспособных клеток, находящихся в контакте с репрессором экспрессии или системой или содержащих их, заметно снижается на 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100% по сравнению с количеством жизнеспособных клеток в контрольной популяции клеток, которые не находятся в контакте с репрессором экспрессии или системой или не содержат их.

В некоторых вариантах осуществления репрессор экспрессии или систему по настоящему изобретению можно применять для снижения жизнеспособности множества клеток, в том числе раковых клеток и нераковых клеток. В некоторых вариантах осуществления репрессор экспрессии или систему по настоящему изобретению можно применять для снижения жизнеспособности множества раковых клеток в большей степени, чем снижения жизнеспособности множества нераковых клеток. В некоторых вариантах осуществления репрессор экспрессии или систему по настоящему изобретению можно применять для снижения жизнеспособности множества раковых клеток в 1,05x (т. е. 1,05 раза), 1,1x, 1,15x, 1,2x, 1,25x, 1,3x, 1,35x, 1,4x, 1,45x, 1,5x, 1,6x, 1,7x, 1,8x, 1,9x, 2x,

3х, 4х, 5х, 6х, 7х, 8х, 9х, 10х, 20х, 50х, или 100х в большей степени, чем снижения жизнеспособности множества нераковых клеток.

В некоторых вариантах осуществления репрессор экспрессии или систему по настоящему изобретению можно применять для снижения жизнеспособности множества клеток, в том числе инфицированных клеток и неинфицированных клеток. В некоторых вариантах осуществления репрессор экспрессии или систему по настоящему изобретению можно применять для снижения жизнеспособности множества инфицированных клеток в большей степени, чем снижения жизнеспособности множества неинфицированных клеток. В некоторых вариантах осуществления репрессор экспрессии или систему по настоящему изобретению можно применять для снижения жизнеспособности множества инфицированных клеток в 1,05х (т. е. 1,05 раза), 1,1х, 1,15х, 1,2х, 1,25х, 1,3х, 1,35х, 1,4х, 1,45х, 1,5х, 1,6х, 1,7х, 1,8х, 1,9х, 2х, 3х, 4х, 5х, 6х, 7х, 8х, 9х, 10х, 20х, 50х, или 100х в большей степени, чем снижения жизнеспособности множества неинфицированных клеток.

Система репрессии экспрессии может содержать множество репрессоров экспрессии, где каждый репрессор экспрессии содержит эффекторную функциональную группу с функциональным свойством, отличным от такового у эффекторной функциональной группы другого репрессора экспрессии. Например, система репрессии экспрессии может содержать два репрессора экспрессии, где первый репрессор экспрессии содержит первую эффекторную функциональную группу, содержащую эпигенетическую модифицирующую функциональную группу, например ДНК-метилтрансферазу, например MQ1, а второй репрессор экспрессии содержит вторую эффекторную функциональную группу, содержащую репрессор транскрипции, например KRAB. В некоторых вариантах осуществления второй репрессор экспрессии не содержит вторую эффекторную функциональную группу. В некоторых вариантах осуществления система репрессии экспрессии содержит репрессоры экспрессии, содержащие комбинацию эффекторных функциональных групп, функциональные свойства которых дополняют друг друга в отношении подавления экспрессии гена-мишени, например MYC, где функциональные свойства совместно обеспечивают подавление экспрессии и необязательно не подавляют или незначительно подавляют экспрессию, когда присутствуют по отдельности. В некоторых вариантах осуществления система репрессии экспрессии содержит множество репрессоров экспрессии, где каждый репрессор экспрессии содержит эффекторную функциональную группу, которая дополняет эффекторные функциональные группы каждого другого репрессора экспрессии, например, каждая эффекторная функциональная группа снижает экспрессию гена-мишени, например MYC.

В некоторых вариантах осуществления система репрессии экспрессии содержит репрессоры экспрессии, содержащие комбинацию эффекторных функциональных групп, функциональные свойства которых действуют синергически друг с другом в отношении подавления экспрессии гена-мишени, например MYC. Без ограничения какой-либо

теорией, эпигенетические модификации геномного локуса могут быть кумулятивными, поскольку множественные репрессивные эпигенетические маркеры (например, несколько различных типов эпигенетических маркеров и/или более обширная маркировка данного типа) по отдельности совместно снижают уровень экспрессии более эффективно, чем только отдельные модификации (например, вызывая большее снижение уровня экспрессии и/или более продолжительное снижение уровня экспрессии). В некоторых вариантах осуществления система репрессии экспрессии содержит множество репрессоров экспрессии, где каждый репрессор экспрессии содержит эффекторную функциональную группу, которая действуют синергически с эффекторными функциональными группами каждого другого репрессора экспрессии, например, каждая эффекторная функциональная группа снижает экспрессию гена-мишени, например MYC.

В некоторых вариантах осуществления репрессор экспрессии или система модулирует (например, снижает) экспрессию гена-мишени, например MYC, путем изменения одного или нескольких эпигенетических маркеров, связанных с геном-мишенью, например MYC, или последовательностью контроля экспрессии, функционально связанной с ним. В некоторых вариантах осуществления изменение предусматривает снижение уровня эпигенетического маркера, связанного с геном-мишенью, например MYC, или последовательностью контроля экспрессии, функционально связанной с ним. К эпигенетическим маркерам относятся без ограничения метилирование ДНК, метилирование гистонов и деацетилирование гистонов.

В некоторых вариантах осуществления изменение уровня эпигенетического маркера снижает уровень эпигенетического маркера, связанного с геном-мишенью, например MYC, или последовательностью контроля экспрессии, функционально связанной с ним, по меньшей мере в 1,05x (т. е. в 1,05 раза), 1,1x, 1,15x, 1,2x, 1,25x, 1,3x, 1,35x, 1,4x, 1,45x, 1,5x, 1,55x, 1,6x, 1,65x, 1,7x, 1,75x, 1,8x, 1,85x, 1,9x, 1,95x, 2x, 3x, 4x, 5x, 6x, 7x, 8x, 9x, 10x, 20x, 30x, 40x, 50x, 60x, 70x, 80x, 90x, или 100x ниже, чем уровень эпигенетического маркера, связанного с геном-мишенью, например MYC, или последовательностью контроля экспрессии, функционально связанной с ним, в клетке, не контактирующей с репрессором экспрессии или системой или не содержащей их. Уровень эпигенетического маркера можно оценить с помощью способов, известных специалистам в данной области, в том числе полногеномного бисульфитного секвенирования, бисульфитного секвенирования со сниженным представительством, бисульфитного секвенирования ампликона, матрицы метилирования, пиросеквенированич, ChIP-seq или ChIP-qPCR. В некоторых вариантах осуществления изменения (например, увеличение или снижение) уровня эпигенетического маркера, например метилирования ДНК, можно проанализировать с помощью бисульфитного геномного секвенирования в точных геномных координатах в соответствии с эталонным геномом hg19, например, в диапазоне chr8:129188693-129189048 в соответствии с эталонным геномом hg19. В некоторых вариантах осуществления изменения (например, увеличение или снижение) уровня эпигенетического маркера, например метилирования ДНК, можно проанализировать с

помощью бисульфитного геномного секвенирования в геномной локализации в соответствии с SEQ ID NO: 123.

CAGAGAAGGAGGAAGTTAATTCACATTCTTAATTTTTTCTAAGGGCAAAAAA
AAAAAAAAAATGCACCAGCTCATTTTCCATCTCTGCTTGGGTCATCAGTGTGCATTG
TGAGCCTGTACAAAGGCCTTAGACGGGGAATGCTGCCGAGAGCATCACCTTTTATGT
CTTCTTTTATATGAAATGTGCCACTTCCCCACTAACCCTGGCTCTGGGCTCTGCCTCT
GCTCTCCTGATGGTGTGTTTATGGTGGATTCAGCATTCTGGGCCACACAAGGAAGCT
GCAGGGGGTGTCCAAGTTCACATGTCCCCGCATTCCAGGCGAATGTTTCTGACATTG
AGCAATGATATGGCTCT (SEQ ID NO: 123)

Репрессор экспрессии или систему по настоящему изобретению можно применять для изменения уровня эпигенетического маркера, связанного с геном-мишенью, например MYC, или последовательностью контроля экспрессии, функционально связанной с ним, в клетке на некоторый период времени. В некоторых вариантах осуществления уровень эпигенетического маркера, связанного с геном-мишенью или последовательностью контроля экспрессии, функционально связанной с ним, в клетке, находящейся в контакте с репрессором экспрессии или системой или содержащей их, значительно снижается на период, составляющий по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 или 24 часа, или не менее 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 10 или 14 дней, или не менее 1, 2, 3, 4 или 5 недель, или не менее 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 месяцев, или по меньшей мере 1, 2, 3, 4 года или 5 лет (например, на неопределенный срок). Необязательно, уровень эпигенетического маркера, связанного с геном-мишенью, например MYC, или последовательностью контроля экспрессии, функционально связанной с ним, в клетке, контактирующей с репрессором экспрессии или системой или содержащей ее, заметно снижается на период.составляющий не более чем 10, 9, 8, 7, 6, 5 лет, 4, 3, 2 года или 1 год.

Комбинации репрессоров

В некоторых вариантах осуществления система репрессии экспрессии содержит первый репрессор экспрессии, содержащий первую эффекторную функциональную группу, и второй репрессор экспрессии, содержащий вторую эффекторную функциональную группу, где первая эффекторная функциональная группа и вторая эффекторная функциональная группа отличаются друг от друга. В некоторых вариантах осуществления первая эффекторная функциональная группа представляет собой или предусматривает первую эпигенетическую модифицирующую функциональную группу (например, которая повышает или снижает уровень первого эпигенетического маркера) или ее функциональный фрагмент, а вторая эффекторная функциональная группа представляет собой или предусматривает вторую эпигенетическую модифицирующую функциональную группу (например, которая повышает или снижает уровень второго эпигенетического маркера) или ее функциональный фрагмент. В некоторых вариантах осуществления первая эффекторная функциональная группа представляет собой или предусматривает ДНК-метилтрансферазу или ее функциональный фрагмент, а вторая

эффекторная функциональная группа представляет собой или предусматривает KRAB или его функциональный фрагмент. В некоторых вариантах осуществления первая эффекторная функциональная группа представляет собой или предусматривает гистондеацетилазу или ее функциональный фрагмент, а вторая эффекторная функциональная группа представляет собой или предусматривает KRAB или его функциональный фрагмент. В некоторых вариантах осуществления первая эффекторная функциональная группа представляет собой или предусматривает гистонметилтрансферазу или ее функциональный фрагмент, а вторая эффекторная функциональная группа представляет собой или предусматривает KRAB или его функциональный фрагмент. В некоторых вариантах осуществления первая эффекторная функциональная группа представляет собой или предусматривает гистондеметилазу или ее функциональный фрагмент, а вторая эффекторная функциональная группа представляет собой или предусматривает KRAB или его функциональный фрагмент.

В некоторых вариантах осуществления первая эффекторная функциональная группа представляет собой или предусматривает MQ1, DNMT1, DNMT3A1, DNMT3A2, DNMT3B1, DNMT3B2, DNMT3B3, DNMT3B4, DNMT3B5, DNMT3B6, DNMT3L, HDAC1, HDAC2, HDAC3, HDAC4, HDAC5, HDAC6, HDAC7, HDAC8, HDAC9, HDAC10, HDAC11, SIRT1, SIRT2, SIRT3, SIRT4, SIRT5, SIRT6, SIRT7, SIRT8, SIRT9, KDM1A (т. е. LSD1), KDM1B (т. е. LSD2), KDM2A, KDM2B, KDM5A, KDM5B, KDM5C, KDM5D, KDM4B, NO66, SETDB1, SETDB2, EHMT2 (т. е. G9A), EHMT1 (т. е. GLP), SUV39H1, EZH2, EZH1, SUV39H2, SETD8, SUV420H1, SUV420H2 или функциональный фрагмент любого из них, а вторая эффекторная функциональная группа представляет собой или предусматривает KRAB (например, домен KRAB), MeCP2, HP1, RBBP4, REST, FOG1, SUZ12 или функциональный фрагмент любого из них.

В некоторых вариантах осуществления первая эффекторная функциональная группа представляет собой или предусматривает KRAB (например, домен KRAB), MeCP2, HP1, RBBP4, REST, FOG1, SUZ12 или функциональный фрагмент любого из них, а вторая эффекторная функциональная группа представляет собой или предусматривает MQ1, DNMT1, DNMT3A1, DNMT3A2, DNMT3B1, DNMT3B2, DNMT3B3, DNMT3B4, DNMT3B5, DNMT3B6, DNMT3L, HDAC1, HDAC2, HDAC3, HDAC4, HDAC5, HDAC6, HDAC7, HDAC8, HDAC9, HDAC10, HDAC11, SIRT1, SIRT2, SIRT3, SIRT4, SIRT5, SIRT6, SIRT7, SIRT8, SIRT9, KDM1A (т. е. LSD1), KDM1B (т. е. LSD2), KDM2A, KDM2B, KDM5A, KDM5B, KDM5C, KDM5D, KDM4B, NO66, SETDB1, SETDB2, EHMT2 (т. е. G9A), EHMT1 (т. е. GLP), SUV39H1, EZH2, EZH1, SUV39H2, SETD8, SUV420H1, SUV420H2 или функциональный фрагмент любого из них.

В некоторых вариантах осуществления первая эффекторная функциональная группа представляет собой или предусматривает бактериальный MQ1 или его функциональный вариант или фрагмент, а вторая эффекторная функциональная группа представляет собой или предусматривает KRAB или его функциональный вариант или фрагмент.

В некоторых вариантах осуществления первая эффекторная функциональная группа представляет собой или предусматривает DNMT3A или его функциональный вариант или фрагмент, а вторая эффекторная функциональная группа представляет собой или предусматривает KRAB или его функциональный вариант или фрагмент.

В некоторых вариантах осуществления первая эффекторная функциональная группа представляет собой или предусматривает DNMT3B или его функциональный вариант или фрагмент, а вторая эффекторная функциональная группа представляет собой или предусматривает KRAB или его функциональный вариант или фрагмент.

В некоторых вариантах осуществления первая эффекторная функциональная группа представляет собой или предусматривает DNMT3L или его функциональный вариант или фрагмент, а вторая эффекторная функциональная группа представляет собой или предусматривает KRAB или его функциональный вариант или фрагмент.

В некоторых вариантах осуществления первая эффекторная функциональная группа представляет собой или предусматривает комплекс DNMT3a/3L или его функциональный вариант или фрагмент, а вторая эффекторная функциональная группа представляет собой или предусматривает KRAB или его функциональный вариант или фрагмент.

Сайты-мишени

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

Нацеливающаяся функциональная группа, подходящая для применения в репрессоре экспрессии или репрессоре экспрессии из системы, описанной в данном документе, может связываться, например специфически связываться, с любым сайтом в пределах гена-мишени, например MYC, элементом контроля транскрипции, функционально связанным с геном-мишенью, например MYC, с якорной последовательностью (например, якорной последовательностью, проксимальной по отношению к гену-мишени или ассоциированной с объединением, опосредованным якорной последовательностью, функционально связанным с геном-мишенью, например MYC (например, объединение, опосредованное якорной последовательностью, функционально связано с геном-мишенью, если нарушение объединения изменяет экспрессию гена-мишени, например MYC)) или с регуляторным элементом,

локализованным в области суперэнхансера (например, с регуляторным элементом, локализованным в области суперэнхансера MYC).

В некоторых вариантах осуществления репрессор экспрессии, описанный в данном документе, связывается с сайтом или с локализацией, которые расположены проксимально по отношению к данному сайту. Например, нацеливающаяся функциональная группа может связываться с первым сайтом, проксимальным по отношению к репрессору (второму сайту), и эффекторная функциональная группа, ассоциированная с указанной нацеливающейся функциональной группой, может эпигенетически модифицировать первый сайт таким образом, что эффект энхансера в отношении экспрессии гена-мишени модифицируется по сути так же, как если бы второй сайт (энхансерная последовательность) был связан и/или модифицирован. В некоторых вариантах осуществления сайт, проксимальный по отношению к гену-мишени (например, экзону, интрону или сайту сплайсинга в гене-мишени, например MYC), проксимальный по отношению к элементу контроля транскрипции, функционально связанному с геном-мишенью, например MYC, или проксимальный по отношению к якорной последовательности, расположен на расстоянии менее чем 5000, 4000, 3000, 2000, 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100, 50 или 25 пар оснований от гена-мишени (например, экзона, интрона или сайта сплайсинга в пределах гена-мишени, например MYC), элемента контроля транскрипции или якорной последовательности (и необязательно по меньшей мере 20, 25, 50, 100, 200 или 300 пар оснований от гена-мишени (например, экзона, интрона или сайта сплайсинга в пределах гена-мишени, например MYC), элемента контроля транскрипции или якорной последовательности).

В некоторых вариантах осуществления нацеливающаяся функциональная группа связывается с геном-мишенью, например MYC. В некоторых вариантах осуществления функциональная группа, нацеливающаяся на ДНК, связывается с сайтом в пределах экзона гена-мишени. например

MYC. В некоторых вариантах осуществления нацеливающаяся функциональная группа связывается с сайтом в пределах интрона гена-мишени, например MYC. В некоторых вариантах осуществления нацеливающаяся функциональная группа связывается с сайтом на границе раздела экзона и интрона, например сайтом сплайсинга гена-мишени, например MYC. В некоторых вариантах осуществления нацеливающаяся функциональная группа связывается с сайтом в пределах 5'-UTR гена-мишень, например MYC. В некоторых вариантах осуществления нацеливающаяся функциональная группа связывается с сайтом в пределах 3'-UTR гена-мишень, например MYC. К генам-мишеням относится без ограничения ген, кодирующий MYC.

В некоторых вариантах осуществления нацеливающаяся функциональная группа связывается с элементом контроля транскрипции, функционально связанным с геном-мишенью (например, MYC), например промотором или энхансером. В некоторых вариантах осуществления нацеливающаяся функциональная группа связывается с частью или сайтом в пределах промотора, функционально связанного с геном-мишенью,

например MYC. В некоторых вариантах осуществления нацеливающаяся функциональная группа связывается с сайтом начала транскрипции гена-мишени, например MYC. В некоторых вариантах осуществления нацеливающаяся функциональная группа связывается с частью или сайтом в пределах энхансера, функционально связанного с геном-мишенью, например MYC. В некоторых вариантах осуществления в геномном комплексе (например, ASMC) совместно локализованы два или более элемента геномной последовательности, где к двум или более элементам геномной последовательности относится промотор. Промотор обычно представляет собой элемент последовательности, который инициирует транскрипцию ассоциированного гена. Промоторы обычно находятся вблизи 5'-конца гена, недалеко от сайта инициации его транскрипции. Как известно специалистам средней квалификации, транскрипция генов, кодирующих белок, в эукариотических клетках обычно инициируется путем связывания общих факторов транскрипции (например, TFIID, TFIIE, TFIIH, FUSE, CT-элемент и т. д.) и медиатора с последовательностями корового промотора в виде преинициаторного комплекса, который направляет РНК-полимеразу II к сайту инициации транскрипции и во многих случаях остается связанным с последовательностями корового промотора даже после того, как РНК-полимераза удаляется и инициируется удлинение первичного транскрипта. В некоторых вариантах осуществления промотор предусматривает элемент последовательности, такой как TATA, Inr, DPE или BRE, но специалистам в данной области хорошо известно, что такие последовательности не обязательно необходимы для определения промотора. Специалисты в данной области знакомы с различными положительными (например, энхансерами) или отрицательными (например, репрессорами или сайленсерами) элементами контроля транскрипции, которые ассоциированы с генами. В некоторых вариантах осуществления элемент контроля транскрипции представляет собой сайт связывания фактора транскрипции. Обычно когда родственный регуляторный белок связывается с таким элементом контроля транскрипции, уровень транскрипции ассоциированного гена(-ов) изменяется (например, увеличивается или уменьшается). В некоторых вариантах осуществления нацеливающаяся функциональная группа связывается с геномной последовательностью, локализованной в пределах геномной координаты GRCh37: chr8:129162465-129212140.

В некоторых вариантах осуществления нацеливающаяся функциональная группа связывается с последовательностью-мишенью содержащейся или частично содержащейся в элементе геномной последовательности. В некоторых вариантах осуществления элемент геномной последовательности представляет собой или предусматривает последовательность контроля экспрессии. В некоторых вариантах осуществления элемент геномной последовательности представляет собой или предусматривает ген-мишень, например MYC, или часть гена-мишени, например MYC. В некоторых вариантах осуществления нацеливающаяся функциональная группа связывается с последовательностью-мишенью, которая в длину составляет по меньшей мере 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34 или 35

оснований (и необязательно в длину не более 40, 39, 38, 37, 36, 35, 34, 33, 32, 31, 30, 29, 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21 или 20 оснований). В некоторых вариантах осуществления нацеливающаяся функциональная группа связывается с последовательностью-мишенью, которая в длину составляет 10-30, 15-30, 15-25, 18-24, 19-23, 20-23, 21-23 или 22-23 оснований. В некоторых вариантах осуществления последовательность-мишень в длину составляет 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 или 40 оснований. В некоторых вариантах осуществления элемент геномной последовательности представляет собой или предусматривает якорную последовательность.

Каждый ASMC предусматривает одну или несколько якорных последовательностей, например множество. В некоторых вариантах осуществления над якорными последовательностями можно производить манипуляции или вносить в них изменения для модулирования (например, разрушения) встречающегося в природе геномного комплекса (например, ASMC) или для образования нового геномного комплекса (например, ASMC) (например, для образования не встречающегося в природе геномного комплекса (например, ASMC) с экзогенной или измененной якорной последовательностью). В некоторых вариантах осуществления объединение, опосредованное якорной последовательностью, может быть разрушено для изменения, например подавления, например снижения уровня экспрессии гена-мишени. С помощью таких разрушений можно модулировать экспрессию генов, например, путем изменения топологической структуры ДНК, например, путем модулирования способности гена-мишени взаимодействовать с элементом контроля транскрипции (например, усиливающая последовательность и последовательность сайленсинга/репрессивная последовательность).

В некоторых вариантах осуществления нацеливающаяся функциональная группа связывается с якорной последовательностью, например якорной последовательностью, проксимальной по отношению к гену-мишени, например MYC, или ассоциированной с объединением, опосредованным якорной последовательностью, функционально связанным с геном-мишенью, например MYC (например, объединение, опосредованное якорной последовательностью (ASMC), функционально связано с геном-мишенью, например MYC, если разрушение объединения изменяет уровень экспрессии гена-мишени, например MYC). В целом, якорная последовательность представляет собой элемент геномной последовательности, с которым специфически связывается компонент геномного комплекса, например нуклеирующий полипептид. В некоторых вариантах осуществления связывание компонента геномного комплекса с якорной последовательностью приводит к образованию комплекса, например образованию ASMC. В некоторых вариантах осуществления нацеливающаяся функциональная группа связывается с геном-мишенью, например локусом MYC. Локус обычно определяется как охватывающий транскрибируемую область, промотор и якорные сайты в ASMC, содержащем ген-мишень, например MYC. В некоторых вариантах осуществления

нацеливающаяся функциональная группа связывается с последовательностью, содержащей любую из SEQ ID NO: 75-86 или 199-206. В некоторых вариантах осуществления первая нацеливающаяся функциональная группа связывается с последовательностью, содержащей любую из SEQ ID NO: 75-86, а вторая нацеливающаяся функциональная группа связывается с последовательностью, содержащей любую из SEQ ID NO: 75-86, где первая и вторая нацеливающиеся функциональные группы связываются с одной и той же же последовательностью. В некоторых вариантах осуществления первая нацеливающаяся функциональная группа связывается с последовательностью, содержащей любую из SEQ ID NO: 75-86, а вторая нацеливающаяся функциональная группа связывается с последовательностью, содержащей любую из SEQ ID NO: 75-86, где первая и вторая функциональные группы связываются с отличающимися последовательностями. В некоторых вариантах осуществления первая нацеливающаяся функциональная группа связывается с последовательностью, содержащей любую из SEQ ID NO: 83, 203 или 206, а вторая нацеливающаяся функциональная группа связывается с последовательностью, содержащей SEQ ID NO:77. В некоторых вариантах осуществления первая нацеливающаяся функциональная группа связывается с последовательностью, содержащей SEQ ID NO: 77, а вторая нацеливающаяся функциональная группа связывается с последовательностью, содержащей любую из SEQ ID NO:83, 203 или 206. В некоторых вариантах осуществления первая нацеливающаяся функциональная группа связывается с последовательностью, содержащей любую из SEQ ID NO: 83, 203 или 206, а вторая нацеливающаяся функциональная группа связывается с последовательностью, содержащей любую из SEQ ID NO:199, 204 или 205. В некоторых вариантах осуществления первая нацеливающаяся функциональная группа связывается с последовательностью, содержащей любую из SEQ ID NO: 199, 204 или 205, а вторая нацеливающаяся функциональная группа связывается с последовательностью, содержащей любую из SEQ ID NO:83, 203 или 206. В некоторых вариантах осуществления первая нацеливающаяся функциональная группа связывается с последовательностью, содержащей любую из SEQ ID NO: 83, 203 или 206, а вторая нацеливающаяся функциональная группа связывается с последовательностью, содержащей SEQ ID NO:201. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота, кодирующая первый и второй репрессоры экспрессии, содержит первую область, которая кодирует первый репрессор экспрессии, где первая область находится выше второй области, которая кодирует второй репрессор экспрессии. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота, кодирующая первый и второй репрессоры экспрессии, содержит первую область, которая кодирует первый репрессор экспрессии, где первая область находится ниже второй области, которая кодирует второй репрессор экспрессии. В некоторых вариантах осуществления первая нацеливающаяся функциональная группа связывается с последовательностью, содержащей любую из SEQ ID NO: 75-86 или 199-206, а вторая нацеливающаяся функциональная группа (например,

домен CRISPR/Cas, содержащий gRNA) связывается с последовательностью, содержащей любую из SEQ ID NO: 1-4. В некоторых вариантах осуществления нацеливающаяся функциональная группа связывается с последовательностью, содержащей любую из SEQ ID NO: 96-110. В некоторых вариантах осуществления первая нацеливающаяся функциональная группа связывается с последовательностью, содержащей любую из SEQ ID NO: 96-110, а вторая нацеливающаяся функциональная группа связывается с последовательностью, содержащей любую из SEQ ID NO: 96-110, где первая и вторая нацеливающиеся функциональные группы связываются с одной и той же же последовательностью. В некоторых вариантах осуществления первая нацеливающаяся функциональная группа связывается с последовательностью, содержащей любую из SEQ ID NO: 96-110, а вторая нацеливающаяся функциональная группа связывается с последовательностью, содержащей любую из SEQ ID NO: 96-110, где первая и вторая функциональные группы связываются с отличающимися последовательностями. В некоторых вариантах осуществления первая нацеливающаяся функциональная группа связывается с последовательностью, содержащей любую из SEQ ID NO: 96-110, а вторая нацеливающаяся функциональная группа (например, домен CRISPR/Cas, содержащий gRNA) связывается с последовательностью, содержащей любую из SEQ ID NO: 1-4. В некоторых вариантах осуществления первая нацеливающаяся функциональная группа связывается с последовательностью, содержащей любую из SEQ ID NO:, раскрытых в таблицах 2, 12 или 13, а вторая нацеливающаяся функциональная группа (например, домен CRISPR/Cas, содержащий gRNA) связывается с последовательностью содержащей любую из SEQ ID NO:, раскрытых в таблицах 2, 12 или 13.

Иллюстративные последовательности-мишени раскрыты в таблице 12.

Таблица 12. Иллюстративные последовательности-мишени

| Название | SEQ ID NO: | ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ | КООРДИНАТЫ В ГЕНОМЕ |
|---|---|---|---|
| ZF1-KRAB | 75 | GCTGGAAACCTTGCACCTCGG | GRCh37: chr8:128746267-128746287 |
| ZF2-KRAB | 76 | CTGCTGCCAGTAGAGGGCACA | GRCh37: chr8:128746349-128746369 |
| ZF3-KRAB | 77 | GCCCAGAGAGGGGGCGGAGGG | GRCh37: chr8:128746405-128746425 |
| ZF4-KRAB | 78 | ACGCGGGGAGCAACCAATCGC | GRCh37: chr8:128746455- |

| | | | |
|---|---|---|---|
| | | | 128746475 |
| ZF5-KRAB | 79 | ACTGGCAGCAGAGATCATCGC | GRCh37: chr8:128746339-128746359 |
| ZF6-KRAB | 80 | GGGGGCAGGAGCAGGAGCGTC | GRCh37: chr8:128746287-128746307 |
| ZF7-MQ1 | 81 | CAGCCTTAGCGAGGCGCCCTG | GRCh37: chr8:128747885-128747905 |
| ZF8-MQ1 | 82 | ACTCACAGGACAAGGATGCGG | GRCh37: chr8:128747990-128748010 |
| ZF9-MQ1 | 83 | AGCAAAAGAAAATGGTAGGCG | GRCh37: chr8:128748069-128748089 |
| ZF10-MQ1 | 84 | ACTCAGCCGGGCAGCCGAGCA | GRCh37: chr8:128748143-128748163 |
| ZF11-MQ1 | 85 | CGTACCAGGCTGCAGGGCGCC | GRCh37: chr8:128747897-128747917 |
| ZF12-MQ1 | 86 | AGAGTGGAGGAAAGAAGGGTA | GRCh37: chr8:128747829-128747849 |
| ZF54-KRAB | 199 | ACGGGGAATGCTGCCGAGAGC | GRCh37: chr8:129188825-129188845 |
| ZF61-KRAB | 200 | ACCTGAACCCTGGAAATTATA | GRCh37: chr8:129209866-129209888 |
| ZF67-KRAB | 201 | TAGACGGGGAATGCTGCCGAG | GRCh37: chr8:129188822-129188842 |

| | | | |
|---|---|---|---|
| ZF68-KRAB | 202 | TGACATTGAGCAATGATATGG | GRCh37: chr8:129189024-129189044 |
| Последовательность-мишень 1 ZF09-MQ1-tPT2A-ZF54-KRAB | 203 | AGCAAAAGAAAATGGTAGGCG | GRCh37: chr8:128748069-128748089 |
| Последовательность-мишень 2 ZF09-MQ1-tPT2A-ZF54-KRAB | 204 | ACGGGGAATGCTGCCGAGAGC | GRCh37: chr8:129188825-129188845 |
| Последовательность-мишень 1 ZF54-KRAB-tPT2A-ZF09-MQ1 | 205 | ACGGGGAATGCTGCCGAGAGC | GRCh37: chr8:129188825-129188845 |
| Последовательность-мишень 2 ZF54-KRAB-tPT2A-ZF09-MQ1 | 206 | AGCAAAAGAAAATGGTAGGCG | GRCh37: chr8:128748069-128748089 |

В некоторых вариантах осуществления репрессор экспрессии связывается с геномным локусом, имеющим последовательность, представленную в данном документе, например, любую из SEQ ID NO: 1-4, 75-86, 96-110 или 199-206. Понятно, что во многих случаях связываемый геномный локус содержит двухнитевую ДНК, и этот локус может быть описан путем указания последовательности его смысловой нити или его антисмысловой нити. Таким образом, gRNA, имеющая данную спейсерную последовательность, может вызывать связывание репрессора экспрессии с конкретным геномным локусом, где одна нить геномного локуса имеет последовательность, подобную или идентичную спейсерной последовательности, и другая нить геномного локуса имеет комплементарную последовательность. Обычно связывание gRNA с геномным локусом будет предусматривать некоторое раскручивание геномного локуса и соединение спейсера gRNA с нитью, которой этот спейсер комплементарен.

В некоторых вариантах осуществления нацеливающаяся функциональная группа связывается с якорной последовательностью, например якорной последовательностью, проксимальной по отношению к гену-мишени, например MYC, или ассоциированной с объединением, опосредованным якорной последовательностью, функционально связанным с геном-мишенью, например MYC (например, объединение, опосредованное якорной последовательностью (ASMC), функционально связано с геном-мишенью,

например MYC, если разрушение объединения изменяет уровень экспрессии гена-мишени, например MYC) в геноме мыши. В целом, якорная последовательность представляет собой элемент геномной последовательности, с которым специфически связывается компонент геномного комплекса, например нуклеирующий полипептид. В некоторых вариантах осуществления связывание компонента геномного комплекса с якорной последовательностью приводит к образованию комплекса, например образованию ASMC. В некоторых вариантах осуществления нацеливающаяся функциональная группа связывается с геном-мишенью, например локусом MYC. Локус обычно определяется как охватывающий транскрибируемую область, промотор и якорные сайты в ASMC, содержащем ген-мишень, например MYC. В некоторых вариантах осуществления нацеливающаяся функциональная группа связывается с последовательностью, содержащей любую из SEQ ID NO: 190-192. В некоторых вариантах осуществления нацеливающаяся функциональная группа связывается с последовательностью, содержащей любую из SEQ ID NO:, раскрытых в таблице 18. Иллюстративные последовательности-мишени в геноме мыши раскрыты в таблице 18.

Таблица 18. Иллюстративные последовательности-мишени в геноме мыши

| Название | SEQ ID NO: | ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ | КООРДИНАТЫ В ГЕНОМЕ |
|---|---|---|---|
| ZF15-MQ1 | 190 | AACACAGTTCAGCCGAGCGCT | GRCm38: chr15:61985053-61985073 |
| ZF16-MQ1 | 191 | CGAACAACCGTACAGAAAGGG | GRCm38: chr15:61985079-61985099 |
| ZF17-MQ1 | 192 | GTAAACAGTAATAGCGCAGCA | GRCm38: chr15:61985151-61985171 |

В некоторых вариантах осуществления репрессор экспрессии связывается с геномным локусом, имеющим последовательность, представленную в данном документе, например, любую из SEQ ID NO: 190-192. Понятно, что во многих случаях связываемый геномный локус содержит двухнитевую ДНК, и этот локус может быть описан путем указания последовательности его смысловой нити или его антисмысловой нити.

В одном варианте осуществления соединение, опосредованное якорной последовательностью, содержит петлю, такую как внутрихромосомная петля. В определенных вариантах осуществления объединение, опосредованное якорной последовательностью, имеет множество петель. Одна или несколько петель могут включать первую якорную последовательность, последовательность нуклеиновой кислоты, последовательность контроля транскрипции и вторую якорную

последовательность. В другом варианте осуществления по меньшей мере одна петля включает по порядку первую якорную последовательность, последовательность контроля транскрипции и вторую якорную последовательность или первую якорную последовательность, последовательность нуклеиновой кислоты и вторую якорную последовательность. В еще одном варианте осуществления либо одна, либо обе последовательности нуклеиновой кислоты и последовательность контроля транскрипции локализованы внутри или снаружи петли. В еще одном варианте осуществления одна или несколько петель содержат последовательность контроля транскрипции.

В некоторых вариантах осуществления объединение, опосредованное якорной последовательностью, включает TATA-бокс, CAAT-бокс, GC-бокс или сайт CAP. В некоторых вариантах осуществления объединение, опосредованное якорной последовательностью, содержит множество петель, и где объединение, опосредованное якорной последовательностью, содержит в одной или нескольких петлях по меньшей мере одну из якорной последовательности, последовательности нуклеиновой кислоты и последовательности контроля транскрипции.

В некоторых вариантах осуществления структуру хроматина модифицируют путем замены, добавления или делеции одного или нескольких нуклеотидов в якорной последовательности. В некоторых вариантах осуществления структуру хроматина модифицируют путем замены, добавления или делеции одного или нескольких нуклеотидов в якорной последовательности из объединения, опосредованного якорной последовательностью. В некоторых вариантах осуществления транскрипция ингибируется включением активирующей петли или исключением репрессивной петли. В одном из таких вариантов осуществления в объединении, опосредованном якорной последовательностью, исключена последовательность контроля транскрипции, которая снижает транскрипцию последовательности нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления транскрипция репрессируется включением репрессивной петли или исключением активирующей петли. В одном из таких вариантов осуществления в объединение, опосредованное якорной последовательностью, включена последовательность контроля транскрипции, которая снижает транскрипцию последовательности нуклеиновой кислоты.

Якорные последовательности могут быть несмежными друг с другом. В вариантах осуществления с несмежными якорными последовательностями первая якорная последовательность может быть отделена от второй якорной последовательности фрагментом длиной от приблизительно 500 п. о. до приблизительно 500 млн. н., от приблизительно 750 п. о. до приблизительно 200 млн. н., от приблизительно 1 т. н. до приблизительно 100 млн. н., от приблизительно 25 т. н. до приблизительно 50 млн. н., от приблизительно 50 т. н. до приблизительно 1 млн. н., от приблизительно 100 т. н. до приблизительно 750 т. н., от приблизительно 150 т. н. до приблизительно 15 500 т. н. или от приблизительно 175 т. н. до приблизительно 500 т. н. В некоторых вариантах осуществления первая якорная последовательность от второй якорной

последовательности отделена приблизительно 500 п. о., 600 п. о., 700 п. о., 800 п. о., 900 п. о., 1 т. н., 5 т. н., 10 т. н., 15 т. н., 20 т. н., 25 т. н., 30 т. н., 35 т. н., 40 т. н., 45 т. н., 50 т. н., 55 т. н., 60 т. н., 65 т. н., 70 т. н., 75 т. н., 80 т. н., 85 т. н., 90 т. н., 95 т. н., 100 т. н., 125 т. н., 150 т. н., 175 т. н., 200 т. н., 225 т. н., 250 т. н., 275 т. н., 300 т. н., 350 т. н., 400 т. н., 500 т. н., 600 т. н., 700 т. н., 800 т. н., 900 т. н., 1 млн. н., 2 млн. н., 3 млн. н., 4 млн. н., 5 млн. н., 6 млн. н., 7 млн. н., 8 млн. н., 9 млн. н., 10 млн. н., 15 млн. н., 20 млн. н., 25 млн. н., 50 млн. н., 75 млн. н., 20 100 млн. н., 200 млн. н., 300 млн. н., 400 млн. н., 500 млн. н. или любым размером между данными значениями.

В некоторых дополнительных вариантах осуществления нацеливающаяся функциональная группа вводит по меньшей мере одно из следующего: по меньшей мере одну экзогенную якорную последовательность; изменение по меньшей мере в одном сайте связывания нуклеирующей молекулы объединения, например путем изменения аффинности связывания нуклеирующей молекулы объединения; изменение ориентации по меньшей мере одной общей нуклеотидной последовательности, такой как CTCF-связывающий мотив, YY1-связывающий мотив, ZNF143-связывающий мотив или другой связывающий мотив, упомянутый в данном документе; и замену, добавление или делецию в по меньшей мере одной якорной последовательности, такой как CTCF-связывающий мотив, YY1-связывающий мотив, ZNF143-связывающий мотив или другой связывающий мотив, упомянутый в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления якорная последовательность содержит связывающий мотив нуклеирующего полипептида, например CTCF-связывающий мотив: N(T/C/G)N(G/A/T)CC(A/T/G)(C/G)(C/T/A)AG(G/A)(G/T)GG(C/A/T)(G/A)(C/G)(C/T/A)(G/A/C) (SEQ ID NO: 71), где N представляет собой любой нуклеотид.

CTCF-Связывающий мотив также может иметь противоположную ориентацию, например,
(G/A/C)(C/T/A)(C/G)(G/A)(C/A/T)GG(G/T)(G/A)GA(C/T/A)(C/G)(A/T/G)CC(G/A/T)N(T/C/G)N (SEQ ID NO: 72). Где N представляет собой любой нуклеотид.

В некоторых вариантах осуществления якорная последовательность содержит SEQ ID NO: 71 или SEQ ID NO: 72 или последовательность, на по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% идентичную с любой из SEQ ID NO: 71 или SEQ ID NO: 72.

В некоторых вариантах осуществления якорная последовательность содержит связывающий мотив нуклеирующего полипептида, например YY1-связывающий мотив: CCGCCATNTT (SEQ ID NO: 73), где N представляет собой любой нуклеотид.

YY1-связывающий мотив также может иметь противоположную ориентацию, например, AANATGGCGG (SEQ ID NO: 74), где N представляет собой любой нуклеотид.

В некоторых вариантах осуществления объединение, опосредованное якорной последовательностью, содержит по меньшей мере первую якорную последовательность и вторую якорную последовательность. Например, в некоторых вариантах осуществления

каждая из первой якорной последовательности и второй якорной последовательности может содержать мотив, связывающий нуклеирующий полипептид, например, каждая содержит CTCF-связывающий мотив.

В некоторых вариантах осуществления первая якорная последовательность и вторая якорная последовательность содержат разные последовательности, например, первая якорная последовательность содержит CTCF-связывающий мотив, а вторая якорная последовательность содержит якорную последовательность, отличную от CTCF-связывающего мотива. В некоторых вариантах осуществления каждая якорная последовательность содержит мотив, связывающий нуклеирующий полипептид, и один или несколько фланкирующих нуклеотидов на одной или обеих сторонах мотива, связывающего нуклеирующий полипептид.

Два CTCF-связывающих мотива (например, смежных или несмежных CTCF-связывающих мотива), которые могут образовывать ASMC, могут присутствовать в геноме в любой ориентации, например в одной и той же ориентации (тандем) либо 5'-3' (левый тандем, например два CTCF-связывающих мотива, которые содержат SEQ ID NO:71), либо 3'-5' (правый тандем, например два CTCF-связывающих мотива содержат SEQ ID NO:72) или конвергентной ориентации, где один CTCF-связывающий мотив содержит SEQ ID NO:71, а другой содержит SEQ ID NO:72.

В некоторых вариантах осуществления якорная последовательность содержит CTCF-связывающий мотив, связанный с геном-мишенью (например, MYC), где ген-мишень ассоциирован с заболеванием, нарушением и/или состоянием, например нарушением, обусловленным неправильной регуляцией MYC, например печеночным нарушением (например, гепатокарциномой) или раком легкого.

В некоторых вариантах осуществления способы по настоящему изобретению включают модулирование, например разрушение геномного комплекса (например, ASMC), например, путем модификации структуры хроматина, путем замены, добавления или делеции одного или нескольких нуклеотидов в якорной последовательности, например мотиве, связывающем нуклеирующий полипептид. Один или несколько нуклеотидов могут быть специфически нацелены, например, на целевое изменение, замену, добавление или делецию в якорной последовательности, например мотив, связывающий нуклеирующий полипептид.

В некоторых вариантах осуществления геномный комплекс (например, ASMC) может быть изменен путем изменения ориентации по меньшей мере одного мотива, связывающего нуклеирующий полипептид. В некоторых вариантах осуществления якорная последовательность содержит мотив, связывающий нуклеирующий полипептид, например CTCF-связывающий мотив, и нацеливающаяся функциональная группа вносит изменение в по меньшей мере один мотив, связывающий нуклеирующий полипептид, например, изменяя аффинность связывания для нуклеирующего полипептида.

В некоторых вариантах осуществления перед введением репрессора экспрессии или системы, которые описаны в данном документе, ген-мишень, например MYC,

находится в определенном состоянии экспрессии, например в болезненном состоянии. Например, ген-мишень, например MYC, может иметь высокий уровень экспрессии в больной клетке. При разрушении объединения, опосредованного якорной последовательностью, можно снизить уровень экспрессии гена-мишени, например MYC.

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

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

В некоторых вариантах осуществления система репрессии экспрессии содержит первый репрессор экспрессии, содержащий нацеливающуюся функциональную группу, которая связывает ген-мишень, например экзон, интрон или границу раздела экзона и интрона (например, сайт сплайсинга), и второй репрессор экспрессии, содержащий нацеливающуюся функциональную группу, которая связывает ген-мишень, например экзон, интрон или границу раздела экзона и интрона (например, сайт сплайсинга). В некоторых вариантах осуществления система репрессии экспрессии содержит первый репрессор экспрессии, содержащий нацеливающуюся функциональную группу, которая связывает ген-мишень, например экзон, интрон или границу раздела экзона и интрона (например, сайт сплайсинга), и второй репрессор экспрессии, содержащий нацеливающуюся функциональную группу, которая связывается с элементом контроля транскрипции (например, промотором или энхансером), функционально связанным с геном-мишенью, например MYC. В некоторых вариантах осуществления система репрессии экспрессии содержит первый репрессор экспрессии, содержащий нацеливающуюся функциональную группу, которая связывается с элементом контроля транскрипции (например, промотором или энхансером), функционально связанным с геном-мишенью, и второй репрессор экспрессии, содержащий нацеливающуюся функциональную группу, которая связывается с элементом контроля транскрипции (например, промотором или энхансером), функционально связанным с геном-мишенью. В некоторых вариантах осуществления система репрессии экспрессии содержит первый репрессор экспрессии, содержащий нацеливающуюся функциональную группу, которая

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

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

В некоторых вариантах осуществления ген-мишень представляет собой MYC. В некоторых вариантах осуществления MYC локализован в хромосоме 8 человека. В некоторых вариантах осуществления репрессор экспрессии или система репрессоров экспрессии, которые описаны в данном документе, связываются с сайтом начала транскрипции (TSS) MYC.

Другие композиции

Нуклеиновые кислоты и векторы

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

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

В некоторых вариантах осуществления композиция для доставки репрессора экспрессии, описанного в данном документе, представляет собой или содержит вектор, например вирусный вектор, содержащий одну или несколько нуклеиновых кислот, кодирующих репрессор экспрессии или один или несколько компонентов репрессора экспрессии, которые описаны в данном документе.

В некоторых конкретных вариантах осуществления настоящее изобретение предусматривает композиции нуклеиновых кислот, которые кодируют систему репрессии экспрессии, один или несколько репрессоров экспрессии или их полипептидные части. В некоторых таких вариантах осуществления предусмотренные нуклеиновые кислоты могут

представлять собой или предусматривать ДНК, РНК или любую другую функциональную группу или структурную единицу нуклеиновой кислоты, которые описаны в данном документе, и могут быть получены с помощью любой технологии, описанной в данном документе, или иным способом, доступным из уровня техники (например, синтез, клонирование, амплификация, транскрипция in vitro или in vivo и т. д.). В некоторых вариантах осуществления предусмотренные нуклеиновые кислоты, которые кодируют систему репрессии экспрессии, один или несколько репрессоров экспрессии или их полипептидные части, могут быть функционально ассоциированы с одним или несколькими сигналами репликации, интеграции и/или экспрессии, подходящими и/или достаточными для достижения интеграции, репликации и/или экспрессии предусмотренной нуклеиновой кислоты в системе, представляющей интерес (например, в конкретных клетке, ткани, организме и т. д.).

В некоторых вариантах осуществления композиция для доставки системы репрессии экспрессии, описанной в данном документе, представляет собой или содержит вектор, например вирусный вектор, содержащий одну или несколько нуклеиновых кислот, кодирующих один или несколько компонентов системы репрессии экспрессии, например репрессор(-ы) экспрессии системы репрессии экспрессии, которая описана в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления композиция для доставки репрессора экспрессии, описанного в данном документе, представляет собой или содержит РНК, например mRNA, содержащую одну или несколько нуклеиновых кислот, кодирующих репрессор экспрессии или один или несколько компонентов репрессора экспрессии, которые описаны в данном документе.

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

Нуклеиновые кислоты, которые описаны в данном документе, или нуклеиновые кислоты, кодирующие белок, описанный в данном документе, могут быть включены в вектор. Векторы, в том числе полученные из ретровирусов, таких как лентивирусы, являются подходящими инструментами для достижения долгосрочного переноса генов, поскольку они обеспечивают долгосрочную стабильную интеграцию трансгена и его размножение в дочерних клетках. Примеры векторов включают векторы экспрессии, векторы репликации, векторы генерации зондов и векторы секвенирования. Вектор экспрессии может быть введен в клетку в форме вирусного вектора. Технология вирусных векторов хорошо известна из уровня техники и описана во множестве руководств по вирусологии и молекулярной биологии. Вирусы, которые можно применять в качестве векторов, включают без ограничения ретровирусы, аденовирусы, аденоассоциированные

вирусы, вирусы герпеса и лентивирусы. Как правило, подходящий вектор содержит точку начала репликации, функционирующую в по меньшей мере одном организме, промоторную последовательность, подходящие сайты рестрикционных эндонуклеаз и один или несколько селектируемых маркеров.

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

Дополнительные промоторные элементы, например усиливающие последовательности, могут регулировать частоту инициации транскрипции. Обычно эти последовательности расположены в области 30-110 п. о. выше сайта инициации транскрипции, хотя недавно было показано, что ряд промоторов также содержит функциональные элементы ниже сайта инициации транскрипции.

В некоторых вариантах осуществления репрессор экспрессии или система, описанные в данном документе, воздействуют на энхансерную последовательность. В некоторых вариантах осуществления энхансерная последовательность представляет собой энхансер, протяженный энхансер, теневой энхансер, область контроля локуса (LCR) или суперэнхансер. В некоторых вариантах осуществления суперэнхансер содержит группу энхансеров и других регуляторных элементов. В некоторых вариантах осуществления данные последовательности локализованы в области на 2-2 млн. н. выше или ниже сайта начала транскрипции. В некоторых вариантах осуществления данная область является некодирующей областью. В некоторых вариантах осуществления данная область содержит по меньшей мере один SNP, ассоциированный с повышенным риском развития рака. В некоторых вариантах осуществления данная область ассоциирована с дальней регуляцией гена-мишени, например MYC. В некоторых вариантах осуществления данные области являются специфичными для типа клеток. В некоторых вариантах осуществления суперэнхансер модифицирует (например, повышает или снижает) уровень экспрессии гена-мишени, например экспрессии MYC, путем рекрутирования промотора гена-мишени, например промотора MYC. В некоторых вариантах осуществления суперэнхансер взаимодействует с промотором гена-мишени, например промотором MYC, через сайт стыковки энхансера. В некоторых вариантах осуществления сайт стыковки энхансера представляет собой якорную последовательность. В некоторых вариантах осуществления сайт стыковки энхансера локализован на расстоянии по меньшей мере 100 п. о., 200 п. о., 500 п. о., 1000 п. о., 1500 п. о., 2000 п. о. или 3000 п. о. от промотора гена-мишени, например промотора MYC. В некоторых вариантах осуществления суперэнхансерная область имеет длину по меньшей мере 100 п. о., по меньшей мере 200 п. о., по меньшей мере 300 п. о., по меньшей мере 500 п. о., по меньшей мере 1 т. н., по меньшей мере 2 т. н.,

по меньшей мере 3 т. н., по меньшей мере 5 т. н., по меньшей мере 10 т. н., по меньшей мере 15 т. н., по меньшей мере 20 т. н. или по меньшей мере 25 т. н.

Промежуток между промоторными элементами зачастую является гибким, так что промоторная функция сохраняется, когда элементы инвертированы или перемещены друг относительно друга. В промоторе тимидинкиназы (tk) промежуток между промоторными элементами можно увеличить до 50 п. о. перед тем, как активность начинает снижаться. В зависимости от промотора, по-видимому, отдельные элементы могут функционировать либо совместно, либо независимо для активации транскрипции.

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

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

В некоторых вариантах осуществления подлежащий введению вектор экспрессии также может содержать либо ген селективного маркера, либо репортерный ген, либо и то и другое для облегчения идентификации и отбора экспрессирующих клеток из популяции клеток, которые предполагается трансфицировать или инфицировать посредством вирусных векторов. В некоторых аспектах селективный маркер может переноситься на

отдельном фрагменте ДНК и применяться в процедуре совместной трансфекции. Как селектируемые маркеры, так и репортерные гены могут быть фланкированы подходящими последовательностями контроля транскрипции с обеспечением экспрессии в клетках-хозяевах. Применимые селектируемые маркеры могут включать, например, гены устойчивости к антибиотикам, такие как neo и т. д.

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

Клетки

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

В некоторых вариантах осуществления клетка содержит первую нуклеиновую

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

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

Настоящее изобретение также частично направлено на клетку, полученную посредством способа, описанного в данном документе. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение предусматривает клетку, полученную путем: обеспечения репрессора экспрессии или системы репрессии экспрессии, которые описаны в данном документе, обеспечения клетки и приведения клетки в контакт с репрессором экспрессии (или нуклеиновой кислотой, кодирующей репрессор экспрессии, или композицией, содержащей указанный репрессор экспрессии или нуклеиновую кислоту) или системой репрессии экспрессии (или нуклеиновой кислотой, кодирующей систему репрессии экспрессии, или композицией, содержащей указанную систему репрессии экспрессии или нуклеиновую кислоту). В некоторых вариантах осуществления приведение клетки в контакт с репрессором экспрессии включает приведение клетки в контакт с нуклеиновой кислотой, кодирующей репрессор экспрессии, в условиях, позволяющих клетке продуцировать репрессор экспрессии. В некоторых вариантах осуществления приведение клетки в контакт с репрессором экспрессии включает приведение организма, содержащего клетку, в контакт с репрессором экспрессии или

нуклеиновой кислотой, кодирующей репрессор экспрессии, в условиях, позволяющих клетке продуцировать репрессор экспрессии.

Без ограничения какой-либо теорией, клетка, находящаяся в контакте с описанным в данном документе репрессором экспрессии или системой репрессии экспрессии, может демонстрировать снижение уровня экспрессии гена-мишени (например, MYC) и/или модификацию уровня эпигенетических маркеров, ассоциированных с геном-мишенью, например MYC, элементом контроля транскрипции, функционально связанным с геном-мишенью, например MYC, или якорной последовательностью, проксимальной по отношению к гену-мишени или ассоциированной с объединением, опосредованным якорной последовательностью, функционально связанным с геном-мишенью, например MYC, по сравнению с аналогичной клеткой, которая не находилась в контакте с репрессором экспрессии или системой репрессии экспрессии. В некоторых вариантах осуществления клетка, демонстрирующая указанное снижение уровня экспрессии гена-мишени, например MYC, и/или модификацию уровня эпигенетических маркеров, не содержит репрессор экспрессии или систему репрессии экспрессии. Снижение уровня экспрессии и/или модификация уровня эпигенетических маркеров может сохраняться, например, на период, составляющий по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 или 24 часа, или не менее 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 10 или 14 дней, или не менее 1, 2, 3, 4 или 5 недель, или не менее 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 месяцев, или по меньшей мере 1, 2, 3, 4 года или 5 лет (например, на неопределенный срок) после контакта с репрессором экспрессии или системой репрессии экспрессии.

В некоторых вариантах осуществления клетка, ранее контактировавшая с репрессором экспрессии или системой репрессии экспрессии, сохраняет снижение уровня экспрессии и/или модификацию уровня эпигенетических маркеров после того, как репрессор экспрессии или система репрессии экспрессии больше не присутствуют в клетке, например, на период, составляющий по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 или 24 часа, или по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 10 или 14 дней, или по меньшей мере 1, 2, 3, 4 или 5 недель, или по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 месяцев, или по меньшей мере 1, 2, 3, 4 года или 5 лет (например, на неопределенный срок) после того, как репрессор экспрессии или система репрессии экспрессии больше не присутствует в клетке.

Способы получения систем подавления экспрессии и/или репрессоров экспрессии

В некоторых вариантах осуществления репрессор экспрессии содержит или представляет собой белок и, таким образом, может быть получен посредством способов получения белков. В некоторых вариантах осуществления система репрессии экспрессии, например репрессор(-ы) экспрессии системы репрессии экспрессии, содержит один или несколько белков и, таким образом, может быть получена посредством способов получения белков. Как будет понятно специалисту в данной области, способы получения белков или полипептидов (которые могут быть включены в модулирующие средства, которые описаны в данном документе) являются стандартными в уровне техники. См., в

целом, Smales & James (Eds.), Therapeutic Proteins: Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology), Humana Press (2005); и Crommelin, Sindelar & Meibohm (Eds.), Pharmaceutical Biotechnology: Fundamentals and Applications, Springer (2013).

Белок или полипептид из композиций по настоящему изобретению можно синтезировать биохимически путем применения стандартных твердофазных методик. Такие способы включают эксклюзивный твердофазный синтез, способы парциального твердофазного синтеза, конденсацию фрагментов, классический синтез растворов. Эти способы можно применять, когда пептид является относительно коротким (например, 10 кДа) и/или когда его нельзя получить посредством рекомбинантных методик (т. е. он не кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты), а следовательно предусматривает отличающееся химическое взаимодействие.

Процедуры твердофазного синтеза хорошо известны из уровня техники и дополнительно описаны в John Morrow Stewart and Janis Dillaha Young, Solid Phase Peptide Syntheses, 2nd Ed., Pierce Chemical Company, 1984; и Coin, I., et al., Nature Protocols, 2:3247-3256, 2007.

Для более длинных пептидов можно применять рекомбинантные способы. Способы получения рекомбинантного терапевтического полипептида являются стандартными в уровне техники. См., в целом, Smales & James (Eds.), Therapeutic Proteins: Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology), Humana Press (2005); и Crommelin, Sindelar & Meibohm (Eds.), Pharmaceutical Biotechnology: Fundamentals and Applications, Springer (2013).

Иллюстративные способы получения терапевтического фармацевтического белка или полипептида включают экспрессию в клетках млекопитающих, хотя рекомбинантные белки также могут быть получены с использованием клеток насекомых, дрожжей, бактерий или других клеток под контролем соответствующих промоторов. Векторы экспрессии для клеток млекопитающих могут содержать нетранскрибируемые элементы, такие как точка начала репликации, подходящий промотор и другие 5'- или 3'-фланкирующие нетранскрибируемые последовательности и 5'- или 3'-нетранслируемые последовательности, такие как необходимые сайты связывания рибосомы, сайт полиаденилирования, донорные и акцепторные сайты сплайсинга и последовательности терминации. Последовательности ДНК, полученные из генома вируса SV40, например точку начала репликации, ранний промотор, сайты сплайсинга и полиаденилирования SV40, можно применять для получения других генетических элементов, требуемых для экспрессии гетерологичной последовательности ДНК. Подходящие клонирующие векторы и векторы экспрессии для применения с клетками-хозяевами, являющимися клетками бактерий, грибов, дрожжей и млекопитающих, описаны в Green & Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Fourth Edition), Cold Spring Harbor Laboratory Press (2012).

В тех случаях, когда требуются большие количества белка или полипептида, их можно получить с применением методик, таких как описанные в Brian Bray, Nature

Reviews Drug Discovery, 2:587-593, 2003; и Weissbach & Weissbach, 1988, Methods for Plant Molecular Biology, Academic Press, NY, Section VIII, pp 421-463.

Различные системы культивирования клеток млекопитающих можно применять для экспрессии и получения рекомбинантного белка. Примеры систем экспрессии в клетках млекопитающих включают клетки CHO, клетки COS, линии клеток HeLA и BHK. Способы культивирования клеток-хозяев для получения белковых терапевтических средств описаны в работе Zhou and Kantardjieff (Eds.), Mammalian Cell Cultures for Biologics Manufacturing (Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology), Springer (2014). Композиции, описанные в данном документе, могут содержать вектор, такой как вирусный вектор, например лентивирусный вектор, кодирующий рекомбинантный белок. В некоторых вариантах осуществления вектор, например вирусный вектор, может содержать нуклеиновую кислоту, кодирующую рекомбинантный белок. Композиции, описанные в данном документе, могут включать липидные наночастицы, инкапсулирующие вектор, такой как вирусный вектор, например лентивирусный вектор, кодирующий рекомбинантный белок. В некоторых вариантах осуществления липидная наночастица, инкапсулирующая вектор, например вирусный вектор, может содержать нуклеиновую кислоту, кодирующую рекомбинантный белок.

Очистка белковых терапевтических средств описана в работе Franks, Protein Biotechnology: Isolation, Characterization, and Stabilization, Humana Press (2013); и в Cutler, Protein Purification Protocols (Methods in Molecular Biology), Humana Press (2010). Составление терапевтических средств на основе белка описано в Meyer (Ed.), Therapeutic Protein Drug Products: Practical Approaches to formulation in the Laboratory, Manufacturing, and the Clinic, Woodhead Publishing Series (2012).

Белки содержат одну или несколько аминокислот. Аминокислоты включают любое соединение и/или вещество, которое может быть включено в полипептидную цепь, например, посредством образования одной или нескольких пептидных связей. В некоторых вариантах осуществления аминокислота имеет общую структуру $H_2N$-C(H)I-COOH. В некоторых вариантах осуществления аминокислота представляет собой встречающуюся в природе аминокислоту. В некоторых вариантах осуществления аминокислота представляет собой неприродную аминокислоту; в некоторых вариантах осуществления аминокислота представляет собой D-аминокислоту; в некоторых вариантах осуществления аминокислота представляет собой L-аминокислоту. "Стандартная аминокислота" относится к любой из двадцати стандартных L-аминокислот, обычно встречающихся во встречающихся в природе пептидах. "Нестандартная аминокислота" относится к любой аминокислоте, отличной от стандартных аминокислот, независимо от того, получена ли она синтетическим путем или получена из природного источника. В некоторых вариантах осуществления аминокислота, в том числе карбокси- и/или аминоконцевая аминокислота в полипептиде, может содержать структурную модификацию по сравнению с общей структурой, представленной выше. Например, в некоторых вариантах осуществления аминокислота может быть модифицирована путем

метилирования, амидирования, ацетилирования, пэгилирования, гликозилирования, фосфорилирования и/или замены (например, аминогруппы, карбоксильной группы, одного или нескольких протонов и/или гидроксильной группы) по сравнению с общей структурой. В некоторых вариантах осуществления такая модификация может, например, изменять период полужизни в кровотоке полипептида, содержащего модифицированную аминокислоту, по сравнению с полипептидом, содержащим в остальном идентичную немодифицированную аминокислоту. В некоторых вариантах осуществления такая модификация существенно не изменяет соответствующую активность полипептида, содержащего модифицированную аминокислоту, по сравнению с полипептидом, содержащим в остальном идентичную немодифицированную аминокислоту. Как будет ясно из контекста, в некоторых вариантах осуществления термин "аминокислота" может использоваться для обозначения свободной аминокислоты; в некоторых вариантах осуществления его можно использовать для обозначения аминокислотного остатка полипептида.

Фармацевтические композиции, составление, доставка и введение

Настоящее изобретение также частично относится к фармацевтическим композициям, содержащим репрессор экспрессии или систему репрессии экспрессии, например репрессор(-ы) экспрессии, описанные в данном документе, к фармацевтическим композициям, содержащим нуклеиновые кислоты, кодирующие репрессор экспрессии или систему репрессии экспрессии, например репрессор(-ы) экспрессии, описанные в данном документе, и/или к композициям, которые доставляют репрессор экспрессии или систему репрессии экспрессии, например репрессор(-ы) экспрессии, описанные в данном документе, в клетку, ткань, орган и/или субъекту.

Как используется в данном документе, термин "фармацевтическая композиция" относится к активному средству (например, репрессору экспрессии или нуклеиновым кислотам рецептора экспрессии, например системе репрессии экспрессии, например репрессору(-ам) экспрессии системы репрессоров экспрессии или нуклеиновой кислоте, кодирующей то же самое), составленному вместе с одним или несколькими фармацевтически приемлемыми носителями (например, фармацевтически приемлемыми носителями, известными специалистам в данной области). В некоторых вариантах осуществления активное средство присутствует в количестве стандартной дозы, подходящем для введения по терапевтической схеме, которая демонстрирует статистически значимую вероятность достижения заранее определенного терапевтического эффекта при введении соответствующей популяции. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция, содержащая репрессор экспрессии по настоящему изобретению, содержит репрессор экспрессии или нуклеиновую кислоту(-ы), кодирующую его. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция, содержащая систему репрессии экспрессии по настоящему изобретению, содержит либо каждый из репрессоров экспрессии системы репрессии экспрессии, либо нуклеиновую кислоту(-ы), кодирующую то же самое

(например, если система репрессии экспрессии содержит первый репрессор экспрессии и второй репрессор экспрессии, то фармацевтическая композиция содержит первый и второй репрессоры экспрессии). В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит менее чем все репрессоры экспрессии системы репрессии экспрессии, включающей множество репрессоров экспрессии. Например, система репрессии экспрессии может содержать первый репрессор экспрессии и второй репрессор экспрессии, и первая фармацевтическая композиция может содержать первый репрессор экспрессии или нуклеиновую кислоту, кодирующую то же самое, и вторая фармацевтическая композиция может содержать второй репрессор экспрессии или нуклеиновую кислоту, кодирующую то же самое. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция может содержать совместный состав одного или нескольких репрессоров экспрессии или нуклеиновых кислот, кодирующих их.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции могут быть специально составлены для введения в твердой или жидкой форме, включая те, которые адаптированы для следующего: перорального введения, например капли (водные или неводные растворы или суспензии), таблетки, например те, которые предназначены для трансбуккального, подъязычного и системного поглощения, пилюли, порошки, гранулы, пасты для нанесения на язык; парентерального введения, например подкожная, внутримышечная, внутривенная или эпидуральная инъекция в виде, например, стерильных раствора, или суспензии, или состава с замедленным высвобождением; местного применения, например в виде крема, мази, пластыря или спрея с контролируемым высвобождением, наносимых на кожу, в легкие или ротовую полость; введения интравагинально или интраректально, например в виде пессария, крема или пены; введения сублингвально; через глаза; трансдермально или назально в легкие и/или на поверхности других слизистых оболочек.

Как используется в данном документе, термин "фармацевтически приемлемый" относится к тем соединениям, материалам, композициям и/или лекарственным формам, которые в рамках здравого медицинского суждения являются подходящими для применения в контакте с тканями людей и животных без чрезмерного воздействия токсичности, раздражения, аллергической ответной реакции или других проблемы или осложнения в соответствии с разумным соотношением польза/риск.

Как используется в данном документе, термин "фармацевтически приемлемый носитель" означает фармацевтически приемлемый материал, композицию или среду-носитель, такой как жидкий или твердый наполнитель, разбавитель, вспомогательное вещество или материал для инкапсулирования растворителя, участвующий в переносе или транспортировке рассматриваемого соединения из одного органа или части тела в другой орган или часть тела. Каждый носитель должен быть "приемлемым" в том смысле, чтобы он был совместимым с другими ингредиентами состава и не был вредным для пациента. В некоторых вариантах осуществления, например, материалы, которые могут служить в качестве фармацевтически приемлемых носителей, включают: сахара, такие как лактоза,

глюкоза и сахароза; крахмалы, такие как кукурузный крахмал и картофельный крахмал; целлюлозу и ее производные, такие как натрийкарбоксиметилцеллюлоза, этилцеллюлоза и ацетат целлюлозы; порошкообразный трагакант; солод; желатин; тальк; вспомогательные вещества, такие как масло какао и воск для суппозиториев; масла, такие как арахисовое масло, хлопковое масло, сафлоровое масло, кунжутное масло, оливковое масло, кукурузное масло и соевое масло; гликоли, такие как пропиленгликоль; полиолы, такие как глицерин, сорбит, маннит и полиэтиленгликоль; сложные эфиры, такие как этилолеат и этиллаурат; агар; буферные средства, такие как гидроксид магния и гидроксид алюминия; альгиновую кислоту; апирогенную воду; изотонический солевой раствор; раствор Рингера; этиловый спирт; pH-буферные растворы; сложные полиэфиры, поликарбонаты и/или полиангидриды и другие нетоксичные совместимые вещества, используемые в фармацевтических составах.

Как используется в данном документе, термин "фармацевтически приемлемая соль" относится к солям таких соединений, которые подходят для применения в фармацевтических ситуациях, т. е. к солям, которые, в рамках здравого медицинского суждения, подходят для применения в контакте с тканями людей и низших животных без чрезмерной токсичности, раздражения, аллергической реакции и т. п. и соизмеримы с разумным соотношением польза/риск. Фармацевтически приемлемые соли хорошо известны из уровня техники. Например, S. M. Berge, et al. подробно описывают фармацевтически приемлемые соли в J. Pharmaceutical Sciences, 66: 1-19 (1977). В некоторых вариантах осуществления фармацевтически приемлемые соли включают без ограничения соли присоединения нетоксичных кислот, которые представляют собой соли аминогруппы, образованные с неорганическими кислотами, такими как хлористоводородная кислота, бромистоводородная кислота, фосфорная кислота, серная кислота и перхлорная кислота, или с органическими кислотами, такими как уксусная кислота, малеиновая кислота, винная кислота, лимонная кислота, янтарная кислота или малоновая кислота, или с применением других способов, применимых в уровне техники, таких как ионный обмен. В некоторых вариантах осуществления фармацевтически приемлемые соли включают без ограничения адипатные, альгинатные, аскорбатные, аспартатные, бензолсульфонатные, бензоатные, бисульфатные, боратные, бутиратные, камфоратные, камфорсульфонатные, цитратные, циклопентанпропионатные, диглюконатные, додецилсульфатные, этансульфонатные, формиатные, фумаратные, глюкогептонатные, глицерофосфатные, глюконатные, гемисульфатные, гептаноатные, гексаноатные, гидройодидные, 2-гидроксиэтансульфонатные, лактобионатные, лактатные, лауратные, лаурилсульфатные, малатные, малеатные, малонатные, метансульфонатные, 2-нафталинсульфонатные, никотинатные, нитратные, олеатные, оксалатные, пальмитатные, памоатные, пектинатные, персульфатные, 3-фенилпропионатные, фосфатные, пикратные, пивалатные, пропионатные, стеаратные, сукцинатные, сульфатные, тартратные, тиоцианатные, *п*-толуолсульфонатные, ундеканоатные, валератные соли и т. п. Типичные соли щелочных или щелочноземельных металлов включают натриевые, литиевые,

калиевые, кальциевые, магниевые и т. п. В некоторых вариантах осуществления фармацевтически приемлемые соли включают, при необходимости, нетоксичные катионы аммония, четвертичного аммония и амина, образованные с использованием противоионов, таких как галогенид, гидроксид, карбоксилат, сульфат, фосфат, нитрат, алкил с 1-6 атомами углерода, сульфонат и арилсульфонат.

В различных вариантах осуществления настоящее изобретение предусматривает фармацевтические композиции, описанные в данном документе, с фармацевтически приемлемым вспомогательным веществом. Фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество предусматривает вспомогательное вещество, которое можно применять в получении фармацевтической композиции, которая является, как правило, безопасной, нетоксичной и необходимой и включает вспомогательного вещества, которые являются приемлемыми для применения в ветеринарии, а также для фармацевтического применения у человека. Такие вспомогательные вещества могут быть твердыми, жидкими, полутвердыми или, в случае аэрозольной композиции, газообразными.

Фармацевтические препараты могут быть получены согласно традиционным методикам фармации, включая измельчение, смешивание, грануляцию и прессование, когда это необходимо, для форм таблеток; или измельчение, смешивание и наполнение для форм твердых желатиновых капсул. При использовании жидкого носителя препарат может быть в форме сиропа, эликсира, эмульсии или водного или неводного раствора или суспензии. Такой жидкий состав можно вводить непосредственно перорально.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции могут быть составлены для доставки в клетку и/или субъекту любым путем введения. Способы введения субъекту могут включать инъекцию, инфузию, ингаляцию, интраназальную, внутриглазную, местную доставку, доставку внутрь канюли или прием внутрь. Инъекция предусматривает без ограничения внутривенную, внутримышечную, внутриартериальную, интратекальную, интравентрикулярную, интракапсулярную, интраорбитальную, интракардиальную, интрадермальную, интраперитонеальную, транстрахеальную, подкожную, субкутикулярую, внутрисуставную, субкапсулярную, субарахноидальную, интраспинальную, интрацереброспинальную и интрастернальную инъекцию и инфузию. В некоторых вариантах осуществления введение предусматривает вдыхание аэрозоля, например с помощью распыления. В некоторых вариантах осуществления введение является системным (например, пероральным, ректальным, назальным, сублингвальным, трансбуккальным или парентеральным), энтеральным (например, общесистемный эффект, но доставляемый через желудочно-кишечный тракт) или местным (например, местное применение на коже, интравитреальная инъекция). В некоторых вариантах осуществления одну или несколько композиций вводят системно. В некоторых вариантах осуществления введение является непарентеральным, а терапевтическое средство представляет собой парентеральное терапевтическое средство. В некоторых вариантах осуществления введение может быть бронхиальным (например, путем инстилляции бронхов), трансбуккальным, дермальным (которое может

представлять собой или включать, например, одно или несколько из: местного введения в дерму, интрадермального, внутрикожного, трансдермального и т. д.), энтеральным, внутриартериальным, интрадермальным, внутрижелудочным, интрамедуллярным, внутримышечным, интраназальным, интраперитонеальным, интратекальным, внутривенным, интравентрикулярным, в пределах определенного органа (например, внутрипеченочным), мукозальным, назальным, пероральным, ректальным, подкожным, сублингвальным, местным, трахеальным (например, посредством интратрахеальной инстилляции), вагинальным, витреальным и т. д. В некоторых вариантах осуществления введение может представлять собой однократную дозу. В некоторых вариантах осуществления введение может предусматривать введение доз, которое является прерывистым (например, множество доз, разделенных во времени) и/или периодическим (например, отдельные дозы, разделенные общим периодом времени). В некоторых вариантах осуществления введение может предусматривать непрерывное введение доз (например, перфузию) в течение по меньшей мере выбранного периода времени. В некоторых вариантах осуществления субъекту может быть сделано шесть, восемь, десять, 12, 15 или 20 или больше введений во время одного лечения или в течение определенного периода времени в качестве схемы лечения.

В некоторых вариантах осуществления введения можно делать по мере необходимости, например, до тех пор, пока сохраняются симптомы, связанные с заболеванием, нарушением или состоянием. В некоторых вариантах осуществления повторные введения могут быть показаны в течение оставшейся части жизни субъекта. Периоды лечения могут варьировать и могут составлять, например, один день, два дня, три дня, одну неделю, две недели, один месяц, два месяца, три месяца, шесть месяцев, год или дольше.

Доза

Доза вводимого средства или композиции может варьироваться в зависимости, например, от состояния, подлежащего лечению, тяжести заболевания, индивидуальных параметров субъекта, включая возраст, физиологическое состояние, размер и вес, продолжительности лечения, типа лечения, подлежащего осуществлению (если таковые имеются), конкретного пути введения и подобных факторов. Таким образом, вводимая доза средств, описанных в данном документе, может зависеть от таких различных параметров. Доза вводимой композиции также может варьироваться в зависимости от других факторов, таких как пол субъекта, общее состояние здоровья и тяжесть заболевания, подлежащего лечению. Может быть необходимо дать субъекту дозу модулирующего средства или комбинации модулирующих средств, раскрытых в данном документе, которая находится в диапазоне от приблизительно 1 мг/кг до 6 мг/кг, в виде однократной внутривенной инфузии, хотя в зависимости от обстоятельств также может быть назначена более низкая или более высокая доза. Дозу можно повторять при необходимости, например, один раз в день (например, в течение 1-30 дней), один раз в 3 дня (например, в течение 1-30 дней) один раз в 5 дней (например, в течение 1-30 дней),

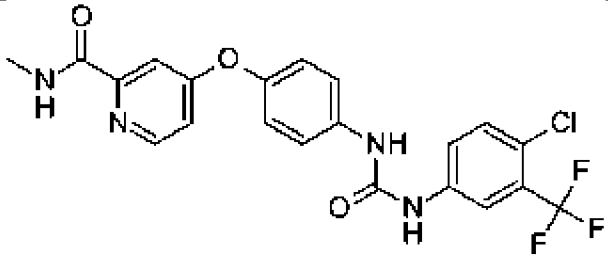
один раз в неделю (например, в течение 1-6 недель или 2-5 недель). В некоторых вариантах осуществления дозы могут включать без ограничения 1,0 мг/кг - 6 мг/кг, 1,0 мг/кг - 5 мг/кг, 1,0 мг/кг - 4 мг/кг, 1,0-3,0 мг/кг, 1,5 мг/кг - 3,0 мг/кг, 1,0 мг/кг - 1,5 мг/кг, 1,5 мг/кг - 3 мг/кг, 3 мг/кг - 4 мг/кг, 4 мг/кг - 5 мг/кг или 5 мг/кг - 6 мг/кг. Дозу можно вводить несколько раз, например один или два раза в неделю или один раз каждые 1 или 2 недели. В некоторых вариантах осуществления субъекту вводят дозу модулирующего средства или комбинации модулирующих средств, раскрытых в данном документе, которая находится в диапазоне от приблизительно 1 мг/кг до 6 мг/кг в виде многократных внутривенных инфузий, хотя более низкая или более высокая дозы также могут быть назначены в зависимости от обстоятельств.

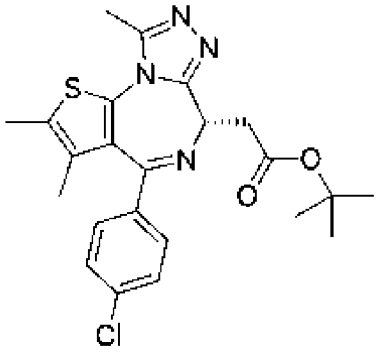
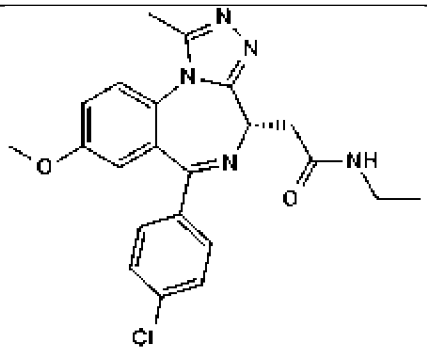
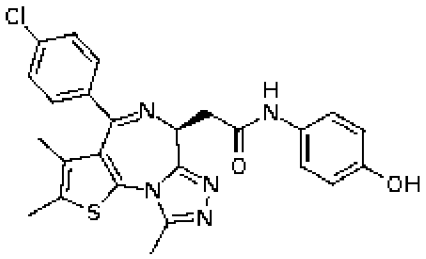
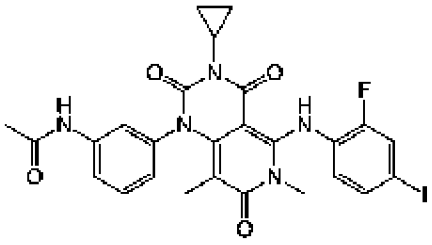
Модулирующее средство или комбинацию модулирующих средств, которые раскрыты в данном документе, можно вводить в виде одной дозы каждые 3-5 дней, повторяя в течение в общей сложности по меньшей мере 3 доз. В качестве альтернативы, модулирующее средство или комбинацию модулирующих средств, которые раскрыты в данном документе, можно вводить в дозе 3 мг/кг каждые 5 дней в течение 25 дней. В качестве альтернативы, модулирующее средство или комбинацию модулирующих средств, которые раскрыты в данном документе, можно вводить в дозе 1,0-5,0 мг/кг каждые 3-5 дней в течение 1-10 доз. В качестве альтернативы, модулирующее средство или комбинацию модулирующих средств, которые раскрыты в данном документе, можно вводить в дозе 1,0-3,0 мг/кг каждые 5 дней в течение 3 доз, затем каждые 3 дня в течение 3 доз. В качестве альтернативы, модулирующее средство или комбинацию модулирующих средств, которые раскрыты в данном документе, можно вводить в дозе 1,0-3,0 мг/кг каждые 5 дней в течение 4 доз, затем каждые 3 дня в течение 3 доз. В качестве альтернативы, модулирующее средство или комбинацию модулирующих средств, которые раскрыты в данном документе, можно вводить в дозе 6 мг/кг каждые 5 дней в течение 1-10 доз. В качестве альтернативы, модулирующее средство или комбинацию модулирующих средств, которые раскрыты в данном документе, можно вводить в дозе 3 мг/кг каждые 5 дней в течение 1-10 доз. В качестве альтернативы, модулирующее средство или комбинацию модулирующих средств, которые раскрыты в данном документе, можно вводить в дозе 1,5 мг/кг каждые 5 дней в течение 2 доз, 3 мг/кг каждые 5 дней в течение 3 доз, 3 мг/кг каждые 3 дня в течение 1 дозы. В качестве альтернативы, модулирующее средство или комбинацию модулирующих средств, которые раскрыты в данном документе, можно вводить в дозе 6 мг/кг каждые 5 дней или в дозе 1,5 мг/кг один раз в день в течение 5 дней с 2-дневным перерывом. Схему введения доз необязательно можно повторить с другими интервалами, а дозу можно вводить различными парентеральными путями с соответствующей корректировкой дозы и схемы. В некоторых вариантах осуществления введение доз модулирующих средств или комбинации модулирующих средств может предусматривать дозу от 1,0 мг/кг до 6,0 мг/кг, необязательно вводимую либо раз в неделю, либо дважды в неделю, либо раз в две недели. Среднему специалисту в данной области будет понятно, что при выборе дозы

модулирующего средства или комбинации модулирующих средств, которые описаны в данном документе, могут учитываться множество факторов, таких как возраст, пол, вес тела, тяжесть нарушения, подлежащего лечению, и что доза и/или частота введения могут быть увеличены или уменьшены в ходе курса терапии. При необходимости дозу можно вводить повторно, при этом признаки уменьшения объема опухоли наблюдаются уже после 2-8 доз. Дозы и схемы введения, раскрытые в данном документе, оказывают минимальный эффект на общий вес субъекта по сравнению с цисплатином, сорафенибом или низкомолекулярным препаратом сравнения. Рассматриваемые способы могут включать применение CT и/или PET/CT либо MRI через регулярные интервалы времени для измерения ответа опухоли. Также можно отслеживать уровни онкомаркеров в крови. Дозы и/или схемы введения можно корректировать при необходимости в соответствии с результатами визуализации и/или уровнями маркеров в крови.

В некоторых вариантах осуществления композиции, раскрытые в данном документе, можно вводить в комбинации с одним или несколькими терапевтическими средствами или при помощи способов, которые выбраны из хирургической резекции, ингибиторов тирозинкиназы (TKI), например сорафениба, ингибиторов бромодомена, например ингибиторов BET, например JQ1, например BET672, например бирабресиба, ингибиторов MEK (например, траметиниба), ортотопической трансплантации печени, радиочастотной абляции, иммунотерапии, комбинированной терапии иммунных контрольных точек плюс средства на основе антител к сосудистому эндотелиальному фактору роста, фотодинамической терапии (PDT), лазерной терапии, брахитерапии, лучевой терапии, транскатетерной артериальной химио- или радиоэмболизации, стереотаксической лучевой терапии, химиотерапии и/или системной химиотерапии для лечения заболевания или нарушения. В представленной ниже таблице 21 раскрыты иллюстративные терапевтические средства.

Таблица 21. Низкомолекулярные соединения, например, для применения в комбинированной терапии с репрессорами экспрессии, описанными в данном документе

| | |
|---|---|
| сорафениб |  |

| | |
|---|---|
| JQ1 |  |
| BET762 |  |
| бирабресиб |  |
| траметиниб |  |

Фармацевтические композиции в соответствии с настоящим изобретением могут быть доставлены в терапевтически эффективном количестве. Точное терапевтически эффективное количество представляет собой количество композиции, которое дает наиболее эффективные результаты с точки зрения эффективности лечения у данного субъекта. Это количество будет варьироваться в зависимости от множества факторов, включая без ограничения характеристики терапевтического соединения (включая активность, фармакокинетику, фармакодинамику и биодоступность), физиологическое состояние субъекта (включая возраст, пол, тип и стадию заболевания, общее физическое состояние, восприимчивость к данной дозе и тип медицинского средства), характер фармацевтически приемлемого носителя или носителей в составе и/или путь введения.

В некоторых аспектах настоящее изобретение предусматривает способы доставки терапевтического средства, предусматривающие введение субъекту композиции, которая описана в данном документе, где модулирующее средство представляет собой

терапевтическое средство и/или где доставка терапевтического средства вызывает изменения в экспрессии генов по сравнению с экспрессией генов в отсутствие терапевтического средства.

Способы, предусмотренные в различных вариантах осуществления в данном документе, можно применять в любых аспектах, изложенных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько композиций целенаправленно воздействуют на конкретные клетки или одну или несколько конкретных тканей.

Например, в некоторых вариантах осуществления одна или несколько композиций целенаправленно воздействуют на печеночную, эпителиальную, соединительную, мышечную, репродуктивную и/или нервную ткань или клетки. В некоторых вариантах осуществления композиция целенаправленно воздействует на клетку или ткань конкретной системы органов, например сердечно-сосудистой системы (сердце, сосуды); пищеварительной системы (пищевод, желудок, печень, желчный пузырь, поджелудочная железа, кишечник, толстая кишка, прямая кишка и анус); эндокринной системы (гипоталамус, гипофиз, шишковидное тело или шишковидная железа, щитовидная железа, паращитовидные железы, надпочечники); выделительной системы (почки, мочеточники, мочевой пузырь); лимфатической системы (лимфа, лимфатические узлы, лимфатические сосуды, миндалины, аденоиды, тимус, селезенка); покровной системы (кожа, волосы, ногти); мышечной системы (например, скелетные мышцы); нервной системы (головной мозг, спинной мозг, нервы); репродуктивной системы (яичники, матка, молочные железы, яички, семявыводящие протоки, семенные пузырьки, простата); дыхательной системы (глотка, гортань, трахея, бронхи, легкие, диафрагма); костной системы (кости, хрящи) и/или их комбинации.

В некоторых вариантах осуществления композиция по настоящему изобретению проникает через гематоэнцефалический барьер, плацентарную мембрану или гематотестикулярный барьер.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтическую композицию, предусмотренную в данном документе, вводят системно.

В некоторых вариантах осуществления введение является непарентеральным, а терапевтическое средство представляет собой парентеральное терапевтическое средство.

Способы и композиции, предусмотренные в данном документе, могут включать фармацевтическую композицию, вводимую по схеме, достаточной для облегчения симптома заболевания, нарушения и/или состояния. В некоторых аспектах настоящее изобретение предусматривает способы доставки терапевтического средства посредством введения композиций, которые описаны в данном документе.

Варианты фармацевтического применения по настоящему изобретению могут предусматривать композиции (например, модулирующие средства, например разрушающие средства), которые описаны в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция по настоящему изобретению характеризуется улучшенными PK/PD, например повышенной

фармакокинетикой или фармакодинамикой, например улучшенным целенаправленным воздействием, поглощением или транспортом (например, улучшенными на по меньшей мере 5%, 10%, 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 75%, 80%, 90% или больше) по сравнению с активным средством отдельно. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция характеризуется уменьшенными нежелательными эффектами, такими как уменьшенная диффузия в месторасположение, не являющееся мишенью, нецелевая активность или токсический метаболизм, по сравнению с терапевтическим средством отдельно (например, уменьшенными на по меньшей мере 5%, 10%, 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 75%, 80%, 90% или больше по сравнению с активным средством отдельно). В некоторых вариантах осуществления композиция обеспечивает повышение эффективности и/или снижение токсичности терапевтического средства (например, на по меньшей мере 5%, 10%, 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 75%, 80%, 90% или больше) по сравнению с активным средством отдельно.

Фармацевтические композиции, описанные в данном документе, могут быть составлены, например, таким образом, чтобы они содержали носитель, например фармацевтический носитель и/или полимерный носитель, например наночастицу, липосому или везикулу, и доставляться посредством известных способов нуждающемуся в этом субъекту (например, человеку или отличному от человека сельскохозяйственному или домашнему животному, например крупному рогатому скоту, собаке, кошке, лошади, домашней птице). Такие способы включают трансфекцию (например, опосредованную липидами, катионными полимерами, фосфатом кальция); электропорацию или другие способы разрушения мембран (например, нуклеофекцию) и вирусную доставку (например, с помощью лентивируса, ретровируса, аденовируса, AAV). Способы доставки также описаны, например, в работе Gori et al., Delivery and Specificity of CRISPR/Cas9 Genome Editing Technologies for Human Gene Therapy. Human Gene Therapy. July 2015, 26(7): 443-451. Doi:10.1089/hum.2015.074; и Zuris et al. Cationic lipid-mediated delivery of proteins enables efficient protein-based genome editing in vitro and in vivo. Nat Biotechnol. 2014 Oct 30;33(1):73-80.

Липидные наночастицы

Репрессоры экспрессии или системы репрессии экспрессии, которые описаны в данном документе, могут быть доставлены с использованием любой биологической системы доставки/состава, включающей частицу, например системы доставки наночастиц. Наночастицы включают частицы размером (например, диаметром) от приблизительно 1 до приблизительно 1000 нанометров, от приблизительно 1 до приблизительно 500 нанометров, от приблизительно 1 до приблизительно 100 нанометров, от приблизительно 30 нм до приблизительно 200 нм, от приблизительно 50 нм до приблизительно 300 нм, от приблизительно 75 нм до приблизительно 200 нм, от приблизительно 100 нм до приблизительно 200 нм и в любом диапазоне между этими значениями. Наночастица имеет составную структуру наноразмерных размеров. В некоторых вариантах осуществления наночастицы обычно являются сферическими, хотя возможны различные

морфологические типы в зависимости от состава наночастицы. Часть наночастицы, контактирующую с окружающей средой, наружной по отношению к наночастице, как правило, идентифицируют как поверхность наночастицы. В некоторых вариантах осуществления наночастицы имеют наибольший размер в диапазоне от 25 нм до 200 нм. Наночастицы, которые описаны в данном документе, содержат системы доставки, которые могут предусматриваться в любой форме, включая без ограничения твердые, полутвердые, эмульсионные или коллоидные наночастицы. Система доставки наночастиц может включать без ограничения системы на основе липидов, липосомы, мицеллы, микровезикулы, экзосомы или генную пушку. В одном варианте осуществления наночастица представляет собой липидную наночастицу (LNP). В некоторых вариантах осуществления LNP представляет собой частицу, которая содержит множество липидных молекул, физически ассоциированных друг с другом межмолекулярными силами.

В некоторых вариантах осуществления LNP может содержать множество компонентов, например 3-4 компонента. В одном варианте осуществления репрессор экспрессии или фармацевтическую композицию, содержащую указанный репрессор экспрессии (или нуклеиновую кислоту, кодирующую его, или фармацевтическую композицию, содержащую указанную нуклеиновую кислоту репрессора экспрессии), инкапсулируют в LNP. В одном варианте осуществления систему репрессии экспрессии или фармацевтическую композицию, содержащую указанную систему репрессии экспрессии (или нуклеиновую кислоту, кодирующую ее, или фармацевтическую композицию, содержащую указанную нуклеиновую кислоту системы репрессии экспрессии), инкапсулируют в LNP. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота, кодирующая первый репрессор экспрессии, и нуклеиновая кислота, кодирующая второй репрессор экспрессии, присутствуют в одной и той же LNP. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота, кодирующая первый репрессор экспрессии, и нуклеиновая кислота, кодирующая второй репрессор экспрессии, присутствуют в различных LNP. Получение LNP и инкапсуляция модулирующего средства могут быть применены/и адаптированы согласно Rosin et al., Molecular Therapy, том 19, № 12, стр. 1286-2200, декабрь 2011 г.). В некоторых вариантах осуществления композиции липидных наночастиц, раскрытые в данном документе, применимы для экспрессии белка, кодируемого mRNA. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновые кислоты, если они присутствуют в липидных наночастицах, в водном растворе устойчивы к расщеплению нуклеазой.

В некоторых вариантах осуществления составы LNP могут включать CCD-липид, нейтральный липид и/или вспомогательный липид. В некоторых вариантах осуществления состав LNP содержит ионизируемый липид. В некоторых вариантах осуществления ионизируемый липид может представлять собой ионный липид, ионизируемый катионный липид или аминсодержащий липид, который может легко протонироваться. В некоторых вариантах осуществления липид представляет собой катионный липид, который может существовать в положительно заряженной или

нейтральной форме в зависимости от pH. В некоторых вариантах осуществления катионный липид представляет собой липид, способный быть положительно заряженным, например, в физиологических условиях. В некоторых вариантах осуществления липидная частица содержит катионный липид в составе с одним или несколькими нейтральными липидами, ионизируемыми аминосодержащими липидами, биоразлагаемыми алкиновыми липидами, стероидами, фосфолипидами, включающими полиненасыщенные липиды, структурными липидами (например, стеринами), PEG, холестерином и липидами, конъюгированными с полимером.

В некоторых вариантах осуществления состав LNP (например, MC3 и/или SSOP) включает холестерин, PEG и/или вспомогательный липид. LNP могут представлять собой, например, микросферы (включая однослойные и многослойные везикулы, липидные бислои ламеллярной фазы, которые в некоторых вариантах осуществления являются по сути сферическими.

В некоторых вариантах осуществления LNP может содержать водное ядро, например, содержащее нуклеиновую кислоту, кодирующую репрессор экспрессии или систему, как описано в данном документе. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения нагрузка для состава LNP включает по меньшей мере одну направляющую РНК. В некоторых вариантах осуществления нагрузка, например нуклеиновая кислота, кодирующая репрессор экспрессии или систему, которые раскрыты в данном документе, может адсорбироваться на поверхности LNP, например LNP, содержащей катионный липид. В некоторых вариантах осуществления нагрузка, например нуклеиновая кислота, кодирующая репрессор экспрессии или систему, которые раскрыты в данном документе, может ассоциироваться с LNP. В некоторых вариантах осуществления нагрузка, например нуклеиновая кислота, кодирующая репрессор экспрессии или систему, которые раскрыты в данном документе, может быть инкапсулирована, например полностью инкапсулирована и/или частично инкапсулирована в LNP.

В некоторых вариантах осуществления LNP, содержащую нагрузку, можно вводить для системной доставки, например доставки терапевтически эффективной дозы нагрузки, что может приводить к широкому воздействию активного средства в организме. Системную доставку липидных наночастиц можно осуществлять посредством любого способа, известного из уровня техники, включая, например, внутривенную, внутриартериальную, подкожную и интраперитонеальную доставку. В некоторых вариантах осуществления системную доставку липидных наночастиц осуществляют с помощью внутривенной доставки. В некоторых вариантах осуществления LNP, содержащую нагрузку, можно вводить для местной доставки, например доставки активного средства непосредственно в целевой участок в организме. В некоторых вариантах осуществления LNP можно локально доставить в пораженный заболеванием участок, например в опухоль, в другой участок-мишень, например в участок воспаления, или в орган-мишень, например в печень, легкое, желудок, толстую кишку,

поджелудочную железу, матку, молочную железу, лимфатические узлы и тому подобное. В некоторых вариантах осуществления LNP, описанную в данном документе, можно локально доставить в конкретную клетку, например в гепатоциты, звездчатые клетки, клетки Купфера, эндотелиальные, альвеолярные и/или эпителиальные клетки. В некоторых вариантах осуществления LNP, описанную в данном документе, можно локально доставить в конкретный участок опухоли, например подкожный, ортотопический.

LNP могут быть составлены в виде дисперсной фазы в эмульсии, мицелл или внутренней фазы в суспензии. В некоторых вариантах осуществления LNP являются биоразлагаемыми. В некоторых вариантах осуществления LNP не накапливаются до цитотоксических уровней и не вызывают токсичность in vivo в терапевтически эффективной дозе. В некоторых вариантах осуществления LNP не накапливаются до цитотоксических уровней и не вызывают токсичность in vivo после повторного введения в терапевтически эффективной дозе. В некоторых вариантах осуществления LNP не вызывают врожденного иммунного ответа, который приводит к существенному неблагоприятному эффекту в терапевтически эффективной дозе.

В некоторых вариантах осуществления используемая LNP характеризуется формулой (6Z,9Z,28Z,31Z)-гептатриаконт-6,9,28,31-тетраен-19-ил-4-(диметиламино)бутаноат или ssPalmO-фенил-P4C2-(ssPalmO-Phe, SS-OP). В некоторых вариантах осуществления состав LNP характеризуется формулой (6Z,9Z,28Z,31Z)-гептатриаконт-6,9,28,31-тетраен-19-ил-4-(диметиламино)бутаноат (MC3), 1,2-диолеоил-sn-глицеро-3-фосфохолин (DOPC), холестерин, 1,2-димиристоил-rac-глицеро-3-метоксиполиэтиленгликоль-2000 (PEG2k-DMG), например LNP MC3 или ssPalmO-фенил-P4C2 (ssPalmO-Phe, SS-OP), 1,2-диолеоил-sn-глицеро-3-фосфохолин (DOPC), холестерин, 1,2-димиристоил-rac-глицеро-3-метоксиполиэтиленгликоль-2000 (PEG2k-DMG), например SSOP-LNP.

Липосомы представляют собой сферические везикулярные структуры, состоящие из одно- или многослойного липидного бислоя, окружающего внутренние водные компартменты, и относительно непроницаемого внешнего липофильного фосфолипидного бислоя. Липосомы могут быть анионными, нейтральными или катионными. Липосомы являются биосовместимыми, нетоксичными, могут доставлять как гидрофильные, так и липофильные молекулы лекарственных средств, защищать свой "груз" от разрушения под действием ферментов плазмы крови и транспортировать свою нагрузку через биологические мембраны и гематоэнцефалический барьер (BBB) (см., например, для обзора Spuch and Navarro, Journal of Drug Delivery, том 2011, ID статьи 469679, 12 страниц, 2011. Doi:10.1155/2011/469679).

Везикулы можно получать из нескольких отличающихся типов липидов; однако для образования липосом в качестве носителей лекарственных средств чаще всего используют фосфолипиды. Везикулы могут содержать без ограничения DOTMA, DOTAP, DOTIM, DDAB в отдельности или вместе с холестерином с получением DOTMA и

холестерина, DOTAP и холестерина, DOTIM и холестерина, а также DDAB и холестерина. Способы получения многослойных липидных везикул известны из уровня техники (см., например, патент США № 6693086, идеи которого, относящиеся к получению многослойных липидных везикул, включены в данный документ посредством ссылки). Хотя образование везикул может быть спонтанным при смешивании липидной пленки с водным раствором, его также можно ускорить путем применения силы в форме встряхивания с использованием гомогенизатора, соникатора или экструзионного аппарата (обзор см., например, в Spuch and Navarro, Journal of Drug Delivery, том 2011, ID статьи 469679, 12 страниц, 2011. Doi:10.1155/2011/469679). Экструдированные липиды можно получать посредством экструзии через фильтры с уменьшающимся размером пор, как описано в работе Templeton et al., Nature Biotech, 15:647-652, 1997, идеи которой, относящиеся к получению экструдированных липидов, включены в данный документ посредством ссылки.

Способы и композиции, предусмотренные в данном документе, могут включать фармацевтическую композицию, вводимую по схеме, достаточной для облегчения симптома заболевания, нарушения и/или состояния. В некоторых аспектах настоящее изобретение предусматривает способы доставки терапевтического средства посредством введения композиций, которые описаны в данном документе.

Варианты применения

Настоящее изобретение дополнительно направлено на варианты применения репрессоров экспрессии или систем репрессоров экспрессии, раскрытых в данном документе. Среди прочего, в некоторых вариантах осуществления такие предусмотренные технологии можно применять для достижения модуляции, например репрессии, экспрессии гена-мишени, например MYC, и, например, обеспечения контроля активности, доставки и пенетрантности гена-мишени, например MYC, например в клетке. В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой клетку млекопитающего, например человека. В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой соматическую клетку. В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой первичную клетку. Например, в некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой соматическую клетку млекопитающего. В некоторых вариантах осуществления соматическая клетка млекопитающего представляет собой первичную клетку. В некоторых вариантах осуществления соматическая клетка млекопитающего представляет собой неэмбриональную клетку.

Модулирование уровня экспрессии генов

Настоящее изобретение также частично направлено на способ модулирования, например снижения, уровня экспрессии гена-мишени, например MYC, включающий обеспечение репрессора экспрессии (или нуклеиновой кислоты, кодирующей его, или фармацевтической композиции, содержащей указанную нуклеиновую кислоту репрессора экспрессии) или системы репрессии экспрессии, описанных в данном документе (или нуклеиновой кислоты, кодирующей ее, или фармацевтической композиции, содержащей

указанную систему репрессии экспрессии или нуклеиновую кислоту), и приведение в контакт гена-мишени, например MYC, и/или функционально связанного элемента(-ов) контроля транскрипции с репрессором экспрессии или системой репрессии экспрессии. В некоторых вариантах осуществления модулирование, например снижение, уровня экспрессии гена-мишени, например MYC, предусматривает модулирование уровня транскрипции гена-мишени, например MYC, по сравнению с эталонным значением, например транскрипцию гена-мишени, например MYC, в отсутствие репрессора экспрессии или системы репрессии экспрессии. В некоторых вариантах осуществления способ модулирования, например снижения, уровня экспрессии гена-мишени, например MYC, применяют ex vivo, например в клетке субъекта, например субъекта-млекопитающего, например субъекта-человека. В некоторых вариантах осуществления способ модулирования, например снижения, уровня экспрессии гена-мишени, например MYC, применяют in vivo, например у субъекта-млекопитающего, например у субъекта-человека. В некоторых вариантах осуществления способ модулирования, например снижения, уровня экспрессии гена-мишени, например MYC, применяют in vitro, например в клетке или линии клеток, описанных в данном документе.

Настоящее изобретение также частично направлено на способ лечения состояния, ассоциированного с неправильной регуляцией, например сверхэкспрессией, гена-мишени, например MYC, у субъекта, включающий введение субъекту репрессора экспрессии (или нуклеиновой кислоты, кодирующей его, или фармацевтической композиции, содержащей указанный репрессор экспрессии или нуклеиновую кислоту), или системы репрессии экспрессии, описанной в данном документе (или нуклеиновой кислоты, кодирующей ее, или фармацевтической композиции, содержащей указанную систему репрессии экспрессии или нуклеиновую кислоту). Состояния, ассоциированные со сверхэкспрессией конкретных генов, известны специалистам в данной области. Такие состояния включают без ограничения метаболические нарушения, рак (например, солидные опухоли) и гепатит.

С применением способов и композиций, предусмотренных в данном документе, можно лечить состояние, ассоциированное со сверхэкспрессией или нарушением регуляции гена-мишени, например MYC, путем стабильного или временного изменения (например, снижения) уровня транскрипции гена-мишени, например MYC. В некоторых вариантах осуществления такая модуляция сохраняется в течение от по меньшей мере приблизительно 1 часа до приблизительно 30 дней или в течение по меньшей мере приблизительно 2 часов, 6 часов, 12 часов, 18 часов, 24 часов, 2 дней, 3 дней, 4 дней, 5 дней, 6 дней, 7 дней, 8 дней, 9 дней, 10 дней, 11 дней, 12 дней, 13 дней, 14 дней, 15 дней, 16 дней, 17 дней, 18 дней, 19 дней, 20 дней, 21 дня, 22 дней, 23 дней, 24 дней, 25 дней, 26 дней, 27 дней, 28 дней, 29 дней, 30 дней или дольше или любого периода времени в промежутке между этими значениями. В некоторых вариантах осуществления такая модуляция сохраняется в течение по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 или 24 часов, или по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7

дней, или по меньшей мере 1, 2, 3, 4 или 5 недель, или по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 месяцев, или по меньшей мере 1 года, 2, 3, 4 или 5 лет (например, в течение постоянного или неопределенного периода времени). Необязательно такая модуляция сохраняется на период не более чем 10, 9, 8, 7, 6, 5 лет, 4, 3, 2 года или 1 год.

В некоторых вариантах осуществления посредством способа или композиции, предусмотренных в данном документе, можно снижать уровень экспрессии гена-мишени, например MYC, в клетке на по меньшей мере 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100% (и необязательно не более 100%) по сравнению с экспрессией гена-мишени в клетке, не находящейся в контакте с композицией или обработанной данным способом.

В некоторых вариантах осуществления посредством способа, предусмотренного в данном документе, можно модулировать, например снижать, уровень экспрессии гена-мишени, например MYC, путем разрушения геномного комплекса, например объединения, опосредованного якорной последовательностью, ассоциированного с указанным геном-мишенью. Ген, который ассоциирован с объединением, опосредованным якорной последовательностью, может располагаться, по меньшей мере частично, в пределах объединения (т. е. расположен по последовательности между первой и второй якорными последовательностями), или он может быть внешним по отношению к объединению в отношении того, что он не расположен по последовательности между первой и второй якорными последовательностями, но расположен в той же хромосоме и в достаточной близости к по меньшей мере первой или второй якорным последовательностям, так что его экспрессию можно модулировать путем контроля топологии объединения, опосредованного якорной последовательностью. Специалистам средней квалификации в данной области будет понятно, что расстояние в трехмерном пространстве между двумя элементами (например, между геном и объединением, опосредованным якорной последовательностью) может в некоторых вариантах осуществления быть более важным, чем расстояние в пересчете на пары оснований. В некоторых вариантах осуществления внешний, но ассоциированный ген расположен в пределах 2 м. о., в пределах 1,9 м. о., в пределах 1,8 м. о., в пределах 1,7 м. о., в пределах 1,6 м. о., в пределах 1,5 м. о., в пределах 1,4 м. о., с 1,3 м. о., в пределах 1,3 м. о., в пределах 1,2 м. о. , в пределах 1,1 м. о., в пределах 1 м. о., в пределах 900 т. о., в пределах 800 т. о., в пределах 700 т. о., в пределах 500 т. о., в пределах 400 т. о., в пределах 300 т. о., в пределах 200 т. о., в пределах 100 т. о., в пределах 50 т. о., в пределах 20 т. о., в пределах 10 т. о. или в пределах 5 т. о. от первой или второй якорной последовательности.

В некоторых вариантах осуществления модулирование экспрессии гена, например MYC, предусматривает изменение доступности последовательности контроля транскрипции для гена, например MYC. Последовательность контроля транскрипции, внутренняя или внешняя по отношению к объединению, опосредованному якорной последовательностью, может представлять собой усиливающую последовательность или последовательность сайленсинга (или репрессивную).

В некоторых вариантах осуществления такие предоставленные технологии можно

применять для лечения нарушения, представляющего собой неправильную регуляцию гена, например нарушения, представляющего собой неправильную регуляцию гена MYC, например симптома, ассоциированного с неправильной регуляцией гена MYC, у субъекта, например нуждающегося в этом пациента. В некоторых вариантах осуществления такие предоставленные технологии можно применять для лечения нарушения, представляющего собой неправильную регуляцию гена MYC или симптома, ассоциированного нарушением, представляющим собой неправильную регуляцию гена MYC, у субъекта, например нуждающегося в этом пациента. В некоторых вариантах осуществления нарушение ассоциировано с неправильной регуляцией MYC, например со сверхэкспрессией MYC. В некоторых вариантах осуществления нарушение ассоциировано с неправильной регуляцией AFP, например со сверхэкспрессией AFP. В некоторых вариантах осуществления такие предоставленные технологии можно применять для метилирования промотора гена-мишени, например MYC, для лечения нарушения, представляющего собой неправильную регуляцию гена, например нарушения, представляющего собой неправильную регуляцию гена MYC, например симптома, ассоциированного с неправильной регуляцией гена MYC, у субъекта, например нуждающегося в этом пациента. В некоторых вариантах осуществления такие предоставленные технологии могут избирательно влиять на жизнеспособность клетки, которая аберрантно экспрессирует полипептид, кодируемый геном-мишенью, например MYC.

В некоторых вариантах осуществления такие предоставленные технологии можно применять для лечения нарушения печени или нарушения, например симптома, ассоциированного с нарушением печени, у субъекта, например нуждающегося в этом пациента. В некоторых вариантах осуществления такие предоставленные технологии можно применять для лечения легочного нарушения или нарушения, например симптома, ассоциированного с нарушением печени, у субъекта, например нуждающегося в этом пациента. В некоторых вариантах осуществления такие предоставленные технологии можно применять для лечения неоплазии, например нарушения или симптома, ассоциированного с неоплазией, у субъекта, например нуждающегося в этом пациента. В некоторых вариантах осуществления такие предоставленные технологии можно применять для лечения нарушений, связанных с вирусной инфекцией, например нарушения или симптома, ассоциированного с нарушением, связанным с вирусной инфекцией, у субъекта, например нуждающегося в этом пациента. В некоторых вариантах осуществления такие предоставленные технологии можно применять для лечения нарушения, связанного со злоупотреблением алкоголем, например нарушения или симптома, ассоциированного с нарушением, связанным со злоупотреблением алкоголем, у субъекта, например нуждающегося в этом пациента. В некоторых вариантах осуществления такие предоставленные технологии можно применять для лечения неопластического нарушения, ассоциированного с вирусной инфекцией или злоупотреблением алкоголем, например нарушения или симптома, ассоциированного с неопластическим нарушением, которое ассоциировано с вирусной инфекцией или

злоупотреблением алкоголем у субъекта, например нуждающегося в этом пациента.

В некоторых вариантах осуществления подвергаемое лечению состояние представляет собой неоплазию. В некоторых вариантах осуществления подвергаемое лечению состояние представляет собой онкогенез. В некоторых вариантах осуществления подвергаемое лечению состояние представляет собой рак. В некоторых вариантах осуществления рак ассоциирован с плохим прогнозом. В некоторых вариантах осуществления рак ассоциирован с неправильной регуляцией MYC, например со сверхэкспрессией MYC. В некоторых вариантах осуществления рак ассоциирован с неправильной регуляцией AFP, например со сверхэкспрессией AFP. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рак молочной железы, печени, толстой кишки, легкого, поджелудочной железы, желудка и/или матки. В некоторых вариантах осуществления рак ассоциирован с инфекцией, например вирусной, например бактериальной. В некоторых вариантах осуществления рак ассоциирован со злоупотреблением алкоголем. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой гепатокарциному.

В некоторых вариантах осуществления раковые клетки представляют собой раковые клетки легких, желудка, желудочно-кишечного тракта, клетки колоректального рака, раковые клетки поджелудочной железы или печени. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой гепатоклеточную карциному (HCC), фиброламеллярную гепатоклеточную карциному (FHCC), холангиокарциному, ангиосаркому, вторичный рак печени, немелкоклеточный рак легкого (NSCLC), аденокарциному, мелкоклеточный рак легкого (SCLC), крупноклеточную (недифференцированную) карциному, трижды негативный рак молочной железы, аденокарциному желудка, карциному эндометрия или карциному поджелудочной железы.

В некоторых вариантах осуществления подвергаемое лечению состояние представляет собой заболевание печени. В некоторых вариантах осуществления подвергаемое лечению состояние ассоциировано с неправильной регуляцией MYC, например со сверхэкспрессией MYC. В некоторых вариантах осуществления подвергаемое лечению состояние представляет собой хроническое заболевание. В некоторых вариантах осуществления подвергаемое лечению состояние представляет собой хроническое заболевание печени. В некоторых вариантах осуществления подвергаемое лечению состояние представляет собой вирусную инфекцию. В некоторых вариантах осуществления подвергаемое лечению состояние представляет собой нарушение, ассоциированное со злоупотреблением алкоголем.

В некоторых вариантах осуществления подвергаемое лечению состояние представляет собой заболевание легких. В некоторых вариантах осуществления подвергаемое лечению состояние ассоциировано с неправильной регуляцией MYC, например со сверхэкспрессией MYC. В некоторых вариантах осуществления подвергаемое лечению состояние представляет собой хроническое заболевание. В некоторых вариантах осуществления подвергаемое лечению состояние представляет

собой хроническое заболевание легких. В некоторых вариантах осуществления такие предоставленные технологии можно применять для лечения или снижения роста рака легкого, его метастазирования, устойчивости к лекарственным средствам и/или поддержания раковых стволовых клеток (CSC). В некоторых вариантах осуществления подвергаемое лечению состояние представляет собой карциному, например немелкоклеточный рак легкого (NSCLC). В некоторых вариантах осуществления хроническое заболевание легкого ассоциировано со злоупотреблением табаком.

В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой гепатокарциному подтипа S1 (HCC S1), гепатокарциному подтипа S2 (HCC S2) или гепатокарциному подтипа S3 (HCC S2). В некоторых вариантах осуществления подтип HCC ассоциирован со сверхэкспрессией MYC. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой HCC S1 или HCC S2. В некоторых вариантах осуществления подтип рака ассоциирован с агрессивной опухолью и плохим клиническим исходом.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение предусматривает схему лечения, которая может быть разработана для субъекта на основе подтипа HCC у субъекта, например персонализированный подход для адаптации агрессивности лечения на основе подтипа HCC у субъекта. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение предусматривает способ лечения с применением репрессоров экспрессии или систем репрессоров экспрессии, раскрытых в данном документе, при этом способ включает идентификацию подтипа HCC у пациента и определение дозы и схемы введения указанных репрессоров экспрессии и/или систем репрессоров экспрессии по результатам идентификации подтипа HCC.

В данном документе описаны способы доставки средств или композиции, которые раскрыты в данном документе, субъекту для лечения нарушения, так чтобы субъект подвергался минимальным побочным эффектам или системной токсичности по сравнению с химиотерапевтическим лечением. В некоторых вариантах осуществления субъект не испытывает каких-либо существенных побочных эффектов, обычно ассоциированных с химиотерапией, при лечении описанными в данном документе средствами и/или композициями. В некоторых вариантах осуществления субъект не испытывает значительного побочного эффекта, в том числе без ограничения алопецию, тошноту, рвоту, плохой аппетит, болезненность, нейтропению, анемию, тромбоцитопению, головокружение, утомляемость, запор, язвы в полости рта, кожный зуд, шелушение, повреждение нервов и мышц, слуховые изменения, потерю веса, диарею, иммуносупрессию, кровоподтеки, поражение сердца, кровотечение, повреждение печени, повреждение почек, отек, язвы во рту и горле, бесплодие, фиброз, выпадение волос, влажное шелушение, сухость слизистой оболочки, головокружение и энцефалопатию при лечении средствами и/или композициями, описанными в данном документе. В некоторых вариантах осуществления у субъекта не наблюдается значительной потери веса тела при лечении описанными в данном документе средствами и/или композициями.

Описанные в данном документе средства и композиции можно вводить субъекту,

например млекопитающему, например in vivo, для лечения или предупреждения ряда нарушений, описанных в данном документе. Сюда входят нарушения, вовлекающие клетки, характеризующиеся измененными паттернами экспрессии MYC.

Эпигенетическая модификация

Настоящее изобретение также частично направлено на способ эпигенетического модифицирования гена-мишени, элемента контроля транскрипции, функционально связанного с геном-мишенью, или якорной последовательности (например, якорной последовательности, проксимальной по отношению к гену-мишени или ассоциированной с объединением, опосредованным якорной последовательностью, функционально связанным с геном-мишенью), при этом способ включает обеспечение репрессора экспрессии (или кодирующей его нуклеиновой кислоты) или системы репрессии экспрессии (например, репрессора(-ов) экспрессии) или нуклеиновой кислоты, кодирующей ее, или фармацевтической композиции, содержащей указанный репрессор экспрессии (или кодирующую его нуклеиновую кислоту) или систему репрессии экспрессии или нуклеиновую кислоту; и приведение в контакт гена-мишени или элемента контроля транскрипции, функционально связанного с геном-мишенью, с репрессором экспрессии или системой репрессии экспрессии, эпигенетически модифицируя таким образом ген-мишень, например MYC, или элемент контроля транскрипции, функционально связанный с геном-мишенью, например MYC.

В некоторых вариантах осуществления способ эпигенетической модификации гена-мишени, например MYC, или элемента контроля транскрипции, функционально связанного с геном-мишенью, например MYC, включает повышение или снижение степени метилирования ДНК гена-мишени, например MYC, или элемента контроля транскрипции, функционально связанного с геном-мишенью, например MYC. В некоторых вариантах осуществления способ эпигенетической модификации гена-мишени, например MYC, или элемента контроля транскрипции, функционально связанного с геном-мишенью, например MYC, включает повышение или снижение степени метилирования гистонов для гистона, ассоциированного с геном-мишенью, например MYC, или элемента контроля транскрипции, функционально связанного с геном-мишенью, например MYC. В некоторых вариантах осуществления способ эпигенетической модификации гена-мишени, например MYC, или элемента контроля транскрипции, функционально связанного с геном-мишенью, например MYC, включает снижение степени ацетилирования гистонов для гистона, ассоциированного с геном-мишенью, например MYC, или элемента контроля транскрипции, функционально связанного с геном-мишенью, например MYC. В некоторых вариантах осуществления способ эпигенетической модификации гена-мишени, например MYC, или элемента контроля транскрипции, функционально связанного с геном-мишенью, например MYC, включает повышение или снижение степени сумоилирования гистонов для гистона, ассоциированного с геном-мишенью, например MYC, или элемента контроля транскрипции, функционально связанного с геном-мишенью, например MYC. В

некоторых вариантах осуществления способ эпигенетической модификации гена-мишени, например MYC, или элемента контроля транскрипции, функционально связанного с геном-мишенью, например MYC, включает повышение или снижение степени фосфорилирования гистонов для гистона, ассоциированного с геном-мишенью, например MYC, или элемента контроля транскрипции, функционально связанного с геном-мишенью, например MYC.

В некоторых вариантах осуществления посредством способа эпигенетической модификации гена-мишени, например MYC, или элемента контроля транскрипции, функционально связанного с геном-мишенью, например MYC, можно снижать уровень эпигенетической модификации на по меньшей мере 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100% (и необязательно не более 100%) по сравнению с уровнем эпигенетической модификации в данном сайте в клетке, не находящейся в контакте с композицией или не обработанной данным способом. В некоторых вариантах осуществления посредством способа эпигенетической модификации гена-мишени, например MYC, или элемента контроля транскрипции, функционально связанного с геном-мишенью, например MYC, можно повышать уровень эпигенетической модификации на по меньшей мере 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 или 1000% (и необязательно не более 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000 или 2000%) по сравнению с уровнем эпигенетической модификации в данном сайте в клетке, не находящейся в контакте с композицией или не обработанной данным способом. В некоторых вариантах осуществления эпигенетическая модификация гена-мишени, например MYC, или элемента контроля транскрипции, функционально связанного с геном-мишенью, например MYC, может модифицировать уровень экспрессии гена-мишени, например MYC, например, как описано в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления эпигенетическая модификация, полученная посредством способа, описанного в данном документе, сохраняется в течение от по меньшей мере приблизительно 1 часа до приблизительно 30 дней или по меньшей мере приблизительно 2 часов, 6 часов, 12 часов, 18 часов, 24 часов, 2 дней, 3 дней, 4 дней, 5 дней, 6 дней, 7 дней, 8 дней, 9 дней, 10 дней, 11 дней, 12 дней, 13 дней, 14 дней, 15 дней, 16 дней, 17 дней, 18 дней, 19 дней, 20 дней, 21 дня, 22 дней, 23 дней, 24 дней, 25 дней, 26 дней, 27 дней, 28 дней, 29 дней, 30 дней или дольше или в течение любого времени между ними. В некоторых вариантах осуществления такая модуляция сохраняется в течение по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 или 24 часов, или по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7 дней, или по меньшей мере 1, 2, 3, 4 или 5 недель, или по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 месяцев, или по меньшей мере 1, 2, 3, 4 или 5 лет (например, в течение неопределенного периода времени). Необязательно такая модуляция сохраняется на период не более чем 10, 9, 8, 7, 6, 5 лет, 4, 3, 2 года или 1 год.

В некоторых вариантах осуществления репрессор экспрессии или система репрессии экспрессии для применения в способе эпигенетического модифицирования

гена-мишени, например MYC, или элемента контроля транскрипции, функционально связанного с геном-мишенью, например MYC, содержит репрессор экспрессии, содержащий эффекторную функциональную группу, которая представляет собой или предусматривает эпигенетическую модифицирующую функциональную группу.

Например, эффекторная функциональная группа может представлять собой или предусматривать эпигенетическую модифицирующую функциональную группу с ДНК-метилтрансферазной активностью, а эндогенная или встречающаяся в природе последовательность-мишень (например, ген-мишень, например MYC, или элемент контроля транскрипции) может быть изменена с повышением ее степени метилирования (например, уменьшения взаимодействия фактора транскрипции с частью гена-мишени, например MYC, или элементом контроля транскрипции, снижающим связывание нуклеирующего белка с якорной последовательностью и/или нарушающий или предотвращающий образование объединения, опосредованного якорной последовательностью), или может быть изменена со снижением ее степени метилирования (например, усиления взаимодействия фактора транскрипции с частью гена-мишени, например MYC, или элементом контроля транскрипции, усиления связывания нуклеирующего белка с якорной последовательностью и/или стимулирования или увеличения силы объединения, опосредованного якорной последовательностью).

Наборы

Настоящее изобретение также частично направлено на набор, содержащий репрессор экспрессии или систему репрессии экспрессии, например репрессор(-ы) экспрессии, описанный в данном документе. В некоторых вариантах осуществления набор содержит репрессор экспрессии или систему репрессии экспрессии (например, репрессор(-ы) экспрессии системы репрессии экспрессии) и инструкции по применению указанного репрессора экспрессии или системы репрессии экспрессии. В некоторых вариантах осуществления набор содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую репрессор экспрессии, или нуклеиновую кислоту, кодирующую систему репрессии экспрессии или ее компонент (например, репрессор(-ы) экспрессии системы репрессии экспрессии), и инструкции по применению указанного репрессора экспрессии (и/или указанной нуклеиновой кислоты) и/или указанной системы репрессии экспрессии (и/или указанной нуклеиновой кислоты). В некоторых вариантах осуществления набор содержит клетку, содержащую нуклеиновую кислоту, кодирующую репрессор экспрессии, или нуклеиновую кислоту, кодирующую систему репрессии экспрессии или ее компонент (например, репрессор(-ы) экспрессии системы репрессии экспрессии), и инструкции по применению указанной клетки, нуклеиновой кислоты и/или указанного репрессора экспрессии или системы репрессии экспрессии.

В некоторых аспектах набор содержит а) контейнер, содержащий композицию, содержащую систему, содержащую два репрессора экспрессии, предусматривающие первый репрессор экспрессии, содержащий первую нацеливающуюся функциональную группу и необязательно первую эффекторную функциональную группу, где первый

репрессор экспрессии связывается с регуляторным элементом транскрипции (например, промотором или сайтом начала транскрипции (TSS)), функционально связанным с геном-мишенью, например MYC, или с последовательностью, проксимальной по отношению к регуляторному элементу транскрипции, и второй репрессор экспрессии, содержащий вторую нацеливающуюся функциональную группу и необязательно эффекторную функциональную группу, где второй репрессор экспрессии связывается с якорной последовательностью из объединения, опосредованного якорной последовательностью (ASMC), содержащего ген-мишень, например MYC, или последовательностью, проксимальной по отношению к якорной последовательности.

В некоторых аспектах набор содержит a) контейнер, содержащий композицию, содержащую систему, содержащую два репрессора экспрессии, предусматривающие первый репрессор экспрессии, содержащий первую нацеливающуюся функциональную группу и необязательно первую эффекторную функциональную группу, где первый репрессор экспрессии связывается с регуляторным элементом транскрипции (например, промотором или сайтом начала транскрипции (TSS)), функционально связанным с геном-мишенью, например MYC, или с последовательностью, проксимальной по отношению к регуляторному элементу транскрипции, и второй репрессор экспрессии, содержащий вторую нацеливающуюся функциональную группу и необязательно эффекторную функциональную группу, где второй репрессор экспрессии связывается с геномным локусом, расположенным в области суперэнхансера гена-мишени, например MYC.

В некоторых вариантах осуществления набор дополнительно содержит b) набор инструкций, предусматривающий по меньшей мере один способ лечения заболевания или модулирования, например снижения, уровня экспрессии гена-мишени, например MYC, в клетке с помощью указанной композиции. В некоторых вариантах осуществления наборы могут необязательно включать средство доставки для указанной композиции (например, липидную наночастицу). Реагенты могут быть предоставлены во взвешенном состоянии во вспомогательном веществе и/или в средстве доставки или могут быть предоставлены в виде отдельного компонента, который впоследствии может быть объединен со вспомогательным веществом и/или средством доставки. В некоторых вариантах осуществления наборы могут необязательно содержать дополнительные терапевтические средства для совместного введения с композициями для воздействия на уровень экспрессии требуемого гена-мишени, например модулирования уровня экспрессии гена MYC. Хотя инструкционные материалы обычно содержат письменные или печатные материалы, они не ограничиваются таковыми. Предполагается любой носитель, способный хранить такие инструкции и передавать их конечному пользователю. Такие носители включают без ограничения электронные носители данных (например, магнитные диски, кассеты, картриджи, чипы), оптические носители (например, CD-ROM) и т. п. Такие средства массовой информации могут включать адреса интернет-сайтов, которые предоставляют такие инструкционные материалы.

В некоторых вариантах осуществления набор содержит единицу дозирования

репрессора экспрессии системы репрессии экспрессии, например репрессора(-ов) экспрессии, описанных в данном документе, или единицу дозирования нуклеиновой кислоты, например вектора, кодирующего систему репрессии экспрессии, например репрессор(-ы) экспрессии, описанной в данном документе.

Следующие примеры представлены для дополнительной иллюстрации некоторых вариантов осуществления настоящего изобретения, однако не предполагают ограничения объема настоящего изобретения; из их иллюстративной природы будет понятно, что в качестве альтернативы можно применять другие процедуры, способы или методики, известные специалистам в данной области.

ПРИМЕРЫ

**Пример 1. Целенаправленная модификация мотива CTCF приводит к снижению уровня MYC**

В данном примере описано редактирование нуклеазой мотива CTCF или области, прилегающей к мотиву CTCF, с помощью Cas9 для снижения уровня экспрессии MYC.

В данном примере были сконструированы четыре sgRNA, комплементарные CpG-островку промоторной области, содержащемуся в экзоне 1, для определения наилучшей области-мишени для прямого опосредованного эпигенетическим эффектором снижения уровня активности генов MYC. Ген c-MYC содержит длинный нетранслируемый экзон 1 (Spencer CA, Groudine M 1991), а экзоны 2 и 3 содержат основные кодирующие области. Редактирование генома производили с применением эффекторов CRISPR-dCas9-KRAB и CRISPR-dCas9-MQ1 (DNMT из бактерий Mollicutes spiroplasma), нацеливаемых четырьмя sgRNA на области CpG-островка промотора MYC с целью идентификации подходящих областей для снижения уровня активности. В качестве контроля для оценки изменений экспрессии MYC использовали как (1) dCas9 (неэффектора) в комбинации с sgRNA, так и (2) необработанные клетки. Данные первоначальные скрининги для выбора sgRNA проводили на легко выращиваемых и трансфицируемых клетках K562 и HEK293, и было установлено, что sgRNA, GD-28617, опосредовала наиболее сильное влияние на снижение уровня mRNA MYC (данные не представлены).

Cas9, нацеленный на мотив CTCF (GD-28616) или вышележащую область, непосредственно смежную с мотивом CTCF (GD-28859) (якорный сайт CTCF), вводили путем трансфекции трем моделям HCC человека (HepG2, Hep3B и SKHEP1) с применением 2,5 мкг/мл состава с SSOP (таблица 11 и фиг. 1A-B). Разрушение мотива CTCF с помощью Cas9 (в комбинации с GD-28616) приводило к снижению уровня экспрессии MYC на 32-39% во всех трех линиях клеток HCC (HepG2, Hep3B и SKHEP1). Разрушение области, смежной по отношению к мотиву CTCF (GD-28859), снижало уровень экспрессии MYC на 35-45% в двух (HepG2 и Hep3B) из трех линий (фиг. 2A). Эффективность редактирования по результатам оценки AmpSeq подтверждала редактирование 77-100% линий клеток (фиг. 2B).

**Таблица 11. Направляющие**

| Название направляющей | Сайт-мишень | Последовательность-мишень | Координаты в геноме |
|---|---|---|---|
| GD-28616 | CTCF | ATGATCTCTGCTGCCAGTAG (SEQ ID NO: 1) | chr8:128746342-128746364 |
| GD-28859 | CTCF | ATCGCGCCTGGATGTCAACG (SEQ ID NO: 2) | chr8:128746321-128746343 |
| GD-28862 | CTCF | ATTGTGCAGTGCATCGGATT (SEQ ID NO: 3) | chr8:128746525-128746547 |
| GD-28617 | Промотор | GTCAAACAGTACTGCTACGG (SEQ ID NO: 4) | chr8:128748014-128748036 |

**Пример 2. Снижение уровня экспрессии MYC1 эффекторами KRAB, слитыми с dCas9sgRNA**

В данном примере описано снижение уровня экспрессии MYC1 путем целенаправленного воздействия эффектора KRAB, слитого с dCas9sgRNA, на мотив CTCF (GD-28616) или вышележащую область, непосредственно смежную с мотивом CTCF (GD-28859) или промотором MYC (GD-28617). Для целенаправленного воздействия на экспрессию MYC в HCC систему CRISPR-dCas9 модифицировали путем связывания ее с KRAB.

В данном примере mRNA dCas9-KRAB доставляли в линии клеток HCC человека (HepG2, Hep3B и SKHEP1) с помощью индивидуальной sgRNA (таблица 1 и фиг. 1A-B), нацеливающей ее на мотив CTCF (GD-28616), "якорный" сайт CTCF (GD-28859) или промотор MYC (GD-28617). Эффекторную mRNA и sgRNA доставляли совместно с помощью доставки в LNP с SSOP. В случае контролей для оценки изменений применяли как (1) dCas9 (неэффектор) в комбинации с sgRNA, так и (2) необработанные клетки. Клетки HCC высевали в 96-луночные планшеты в ростовой среде (5000 клеток/лунку). Затем к клеткам добавляли составы с LNP (2-2,5 мкг/мл) для введения трансфекцией mRNA и sgRNA. Все обработки проводили в трехкратной биологической повторности. Моменты времени в диапазоне от 24 до 168 часов оценивали в отношении экспрессии MYC и жизнеспособности клеток. РНК выделяли из четырех независимых экспериментов с применением набора для 96 луночного планшета RNeasy® plus (Qiagen) в соответствии с протоколом производителя. Образцы РНК подвергали обратной транскрипции в cDNA с помощью набора LunaScript® RT SuperMix Kit (NEB) и анализировали с помощью количественной ПЦР (qPCR) (в трех технических повторностях) с помощью анализа с применением специфичного к MYC набора праймеров/зондов TaqMan™ со смесью

TaqMan™ Fast Advanced Master Mix (Thermo Scientific). Экспрессию MYC количественно оценивали относительно экспрессии эталонных генов GAPDH с помощью способа ΔΔCt. В качестве калибраторов применяли необработанные образцы и образцы dCas9 (неэффектор).

Из экспериментальных данных видно, что LNP-опосредованная трансфекция dCas9-KRAB/GD-28616 снижала уровень экспрессии MYC на 11-34% в моменты времени 48/72 часа у Hep3B и SKHEP1. LNP-опосредованная трансфекция dCas9-KRAB/GD-28859 снижала уровень экспрессии MYC на 18-44% в моменты времени 48/72 часа у 3 моделей HCC (фиг. 3). Данный эффект снижался в двух линиях (Hep3B и SKHEP1) через 168 часов, но уровень экспрессии MYC оставался сниженным на 28% в линии HepG2 через 168 часов (фиг. 3). Направление dCas9-KRAB на промотор MYC посредством dCas9-KRAB/GD-28617 снижало уровень экспрессии MYC на 24-58% в моменты времени 48/72 часа у 3 моделей HCC. Данный эффект снижался в двух линиях (Hep3B и SKHEP1) через 168 часов, но уровень активности MYC оставался сниженным на 43% у HepG2 через 168 часов (фиг. 3).

**Пример 3. Снижение уровня экспрессии MYC1 эффекторами KRAB, слитыми с доменами по типу "цинкового пальца"**

В данном примере описано снижение уровня экспрессии MYC1 путем целенаправленного воздействия эффектора KRAB, слитого с доменами по типу "цинкового пальца", на вышележащую область, непосредственно смежную с мотивом CTCF (GD-28859).

В данном примере были разработаны эффекторы KRAB, направленные на "цинковые пальцы" (эффекторы ZF-KRAB), для связывания якорного сайта в области ДНК, которая является мишенью для GD-28859 (фиг. 4A). Были сконструированы 7 конструкций (dCas-KRAB/GD-59, ZF1-KRAB, ZF2-KRAB, ZF3-KRAB, ZF4-KRAB, ZF5-KRAB и ZF6-KRAB), и они были проверены на моделях HCC человека (HepG2, Hep3B, SKHEP1). Отрицательные контроли для данных экспериментов включали необработанные клетки, а в качестве положительного контроля использовали dCas9-KRAB/GD-28859. РНК выделяли из двух независимых экспериментов, каждый из которых проводился в трех биологических повторностях, с применением набора для 96-луночного планшета Rneasy® Plus (Qiagen) в соответствии с протоколом производителя. Образцы РНК подвергали обратной транскрипции в cDNA с помощью набора LunaScript ® RT SuperMix Kit (NEB) и анализировали с помощью количественной ПЦР (qPCR) (в трех технических повторностях) с применением набора праймеров/зондов TaqMan™, специфичных к MYC, со смесью TaqMan TM Fast Advanced Master Mix (Thermo Scientific). Экспрессию MYC количественно оценивали относительно экспрессии эталонных генов GAPDH с помощью способа ΔΔCt, в качестве калибраторов использовали необработанные образцы и образцы dCas9 (неэффектора). Жизнеспособность клеток оценивали путем количественного определения уровня АТФ с помощью люминесцентного набора для анализа жизнеспособности клеток CellTiter-GLO® (Promega № G9241). Клетки HCC высевали в 96-

луночные планшеты в ростовой среде (5000 клеток/лунку). Затем к клеткам добавляли составы с LNP (0,6-2,5 мкг/мл) для введения трансфекцией mRNA и sgRNA. Все обработки проводили в трехкратной биологической повторности.

Из этих данных было видно, что ZF2-KRAB, ZF3-KRAB и ZF4-KRAB снижали уровень активности MYC в эквивалентной или большей степени, чем dCas9-KRAB/GD-28859 в клетках Hep3B, при этом ZF3-KRAB обладал наиболее сильным снижающим уровень активности эффектом (фиг. 4B). Также было видно, что ZF3-KRAB снижает уровень активности MYC в эквивалентной или большей степени, чем dCas9-KRAB/GD-28859 на двух других моделях HCC, HepG2 и SKHEP1 (фиг. 4C). Также было продемонстрировано, что ZF3-неэффектор (NE) приводит к снижению уровня экспрессии MYC, вероятно, вследствие стерической блокировки регуляторного сайта. Как ZF3-KRAB, так и ZF3-NE в Hep3B демонстрировали снижающие эффекты на уровень экспрессии и жизнеспособность MYC в течение периода 24, 72 и 120 часов (фиг. 4D).

**Пример 4. Снижение уровня экспрессии MYC1 эффекторами MQ1, слитыми с dCas9sgRNA**

В данном примере описано снижение уровня экспрессии MYC1 путем целенаправленного воздействия эффектора MQ1, слитого с dCas9sgRNA, на мотив CTCF (GD-28616), GD-28862 или вышележащую область, непосредственно смежную с мотивом CTCF (GD-28859) или промотором MYC (GD-28617).

В данном примере mRNA dCas9-MQ1 доставляли в линии клеток HCC человека (HepG2, Hep3B и SKHEP1) с помощью индивидуальной sgRNA (таблица 11 и фиг. 1A-B), нацеливающей ее на мотив "якорный" сайт CTCF или промотор MYC. Эффекторную mRNA и sgRNA доставляли совместно с помощью доставки в LNP с SSOP. В случае контролей для оценки изменений применяли как (1) dCas9 (неэффектор) в комбинации с sgRNA, так и (2) необработанные клетки. При проведении эксперимента следовали в основном такому же протоколу, который описан в примере 2.

Из результатов было видно, что dCas9-MQ1, нацеленный на CTCF с помощью GD-16, GD-59 и GD-62, приводил к вариабельному снижению уровня и повышению уровня специфичным для линии клеток образом. dCas9-MQ1, нацеленный на промотор с помощью GD-17, приводил к снижению уровня активности MYC на 50-90% через 72 часа, и снижение сохранялось до 168 часов во всех трех моделях HCC (фиг. 5). Снижение уровня активности MYC резко снижало жизнеспособность HepG2 и Hep3B через 72 и 168 часов, хотя снижение уровня активности MYC минимально влияло на жизнеспособность SK-HEP-1. Контроли dCas9-sgRNA не оказывали влияния на экспрессию или жизнеспособность по сравнению с необработанными контролями.

**Пример 5. Снижение уровня экспрессии MYC1 эффекторами MQ1, слитыми с доменами по типу "цинкового пальца"**

В данном примере описано снижение уровня экспрессии MYC1 путем нацеливания эффектора MQ1, слитого с доменами по типу "цинкового пальца", на промотор MYC (GD-28617).

В данном примере были сконструированы эффекторы MQ1, направленные на "цинковые пальцы" (эффекторы ZF-MQ1), для связывания области ДНК, которая является мишенью для GD-28617 (фиг. 4A и фиг. 6A). Конструировали 6 конструкций (ZF7-MQ1, ZF8-MQ1, ZF9-MQ1, ZF10-MQ1, ZF11-MQ1 и ZF12-MQ1) вокруг GD-28617 для связывания области, идентифицированной в примере 4 при скрининге, и подвергали скринингу на моделях HCC человека (HepG2, Hep3B, SKHEP1). В качестве отрицательного контроля для эксперимента использовали необработанные клетки и клетки, трансфицированные только белком с ZF (ZF-без эффектора или ZF-NE), а в качестве положительного контроля использовали dCas9-KRAB/GD-28859. Следовали протоколу, описанному в примере 3.

Из результатов было видно, что ZF8-MQ1, ZF9-MQ1 и ZF11-MQ1 снижали уровень активности MYC в наибольшей степени в клетках Hep3B, при этом ZF9-MQ1 обладал наиболее сильным эффектом в виде снижения уровня активности (фиг. 6B). Из данных также было видно, что геномные сайты связывания молекул ZF-MQ1, которые успешно снижали экспрессию MYC (ZF8-MQ1, ZF9-MQ1 и ZF11-MQ1), находились в непосредственной близости к молекулам ZF-MQ1, которые не изменяли экспрессии MYC (ZF7-MQ1, ZF10-MQ1 и ZF12-MQ1). Это может быть следствием эффективности связывания, трехмерной ориентации связывания, степени метилирования области или результатом конкретного расположения эффектора по отношению к регуляторным элементам в промоторе MYC. Судя по всему, небольшое смещение сайта связывания ZF-эффектора характеризуется существенными последствиями в отношении регуляции гена MYC. Было обнаружено, что ZF9-MQ1 сильно снижает уровень активности mRNA MYC и снижает жизнеспособность во всех трех моделях HCC, и что эффекты, наблюдаемые с конструкцией ZF9-MQ1, были намного сильнее, чем эффекты, которые могла вызывать система dCas9-MQ1/GD-28617.

**Пример 6. ZF9-MQ1 демонстрирует наиболее сильный снижающий эффект в отношении уровня экспрессии MYC1 по сравнению с другими эффекторами ZF-MQ1**

В данном примере описано, что ZF9-MQ1 оказывает наиболее сильный эффект в отношении снижения уровня экспрессии MYC1 путем нацеливания эффектора MQ1, слитого с доменами по типу "цинкового пальца", на промотор MYC (GD-28617) по сравнению с другими протестированными эффекторами ZF-MQ1.

В данном примере эффект ZF9-MQ1 в отношении снижения экспрессии MYC во всех моделях HCC (HepG2, Hep3B и SKHEP1) сравнивали с эффектом, оказываемым ZF12-MQ1, ZF8-MQ1 и dCas9-MQ1/GD-28617 соответственно. В качестве отрицательного контроля для эксперимента использовали необработанные клетки и клетки, трансфицированные только белком с ZF (ZF-без эффектора или ZF-NE), а в качестве положительного контроля использовали dCas9-KRAB/GD-28859. Следовали протоколу, описанному в примере 3.

Было показано, что ZF9-MQ1 сильно снижает уровень активности MYC и снижает жизнеспособность во всех трех исследованных моделях HCC (Hep3B, HepG2 и SKHEP1)

по сравнению с ZF12-MQ1 (фиг. 7A-C). Регулируемое ZF9-MQ1 снижение уровня экспрессии MYC1 сравнительно превышает снижение уровня, наблюдаемое в присутствии ZF8-MQ1 (фиг. 7D-F), а эффекты, наблюдаемые с конструкцией ZF9-MQ1, намного превышают эффекты, которые могла вызвать система dCas9-MQ1/GD-28617 (фиг. 7G-I). Из данных дополнительно видно, что в то время как ZF9-MQ1 снижал экспрессию MYC уже через 24 часа, эффекты в отношении жизнеспособности не наблюдались до 72 часов или даже позже. В отличие от этого, ZF8-MQ1 вызывал гораздо менее значимые изменения в уровне mRNA MYC и гораздо более быстрое снижение жизнеспособности клеток.

**Пример 7. dCas9-MQ1 оказывает значимо больший эффект в отношении экспрессии MYC, чем dCas9-DNMT1 или dCas9-DNMT-3A-3L человека**

В данном пример продемонстрировано, что dCas9-MQ1 оказывает значимо больший эффект в отношении экспрессии MYC, чем dCas9-DNMT1 или dCas9-DNMT-3A-3L человека.

В данном примере систему CRISPR-dCas9 модифицировали путем связывания ее с выбранными эпигенетическими репрессорами, в том числе KRAB, человеческим DNMT1, продуктом слияния человеческого DNMT3A-3L, прокариотического DNMT человеческого DNMT3Bm и MQ1. Данные молекулы модулируют репрессию транскрипции путем рекрутинга репрессивных комплексов (KRAB) или метилирования CpG-нуклеотидов ДНК (DNMT1, DNMT3A-3L, DNMT3B и MQ1). Для проведения скрининга эффекторов в моделях гепатомы применяли панель линий клеток HCC человека, в том числе HepG2, Hep3B и SKHEP1. sgRNA GD-28617 объединяли с mRNA dCas9-DNMT и совместно доставляли путем трансфекции в LNP в данные линии клеток. В исследованиях CRISPR-Cas9, в которых оценивали эффективность доставки в LNP путем измерения эффективности редактирования sgRNA/Cas9, было подтверждено, что эффективность редактирования при применении данной системы составляла 90-99% (данные не представлены). После трансфекции далее клетки анализировали в отношении уровня экспрессии mRNA MYC с помощью qPCR и в отношении жизнеспособности с помощью CellTiter-GLO® в нескольких моментах времени. Для анализа целенаправленного и глобального метилирования с помощью бисульфитного секвенирования геномную ДНК выделяли с применением набора для экстракции ДНК Lucigen.

Данные исследования демонстрируют, что dCas9-MQ1 оказывает значительно больший эффект в отношении экспрессии MYC, чем любой из исследованных dCas9-DNMT или dCas9-KRAB человека (данные не представлены). dCas9-MQ1 вызывал снижение уровня mRNA на 50-90% через 72 часа в трех линиях (фиг. 8A). Снижение уровня активности MYC резко снижало жизнеспособность HepG2 и Hep3B через 72 и 168 часов, хотя снижение уровня активности MYC минимально влияло на жизнеспособность SK-HEP-1 (фиг. 8B). Контроли dCas9-sgRNA не оказывали влияния на экспрессию или жизнеспособность по сравнению с необработанными контролями.

Поскольку модель SK-HEP-1 демонстрировала минимальные изменения в

отношении жизнеспособности при снижении экспрессии MYC, данную линию использовали для оценки устойчивости эффекта снижения экспрессии MYC. В день 5 уровень mRNA MYC снижался на 80% по сравнению с таковым в случае DBD dCas9 отдельно и необработанными контролями. В день 7 и день 11 уровень mRNA MYC снижался на ~70% и ~55%, соответственно. Вплоть до дня 15 сохранялось ~40% снижение уровня транскрипта (фиг. 8C). С помощью бисульфитного геномного секвенирования, качественного и количественного средства измерения 5-метилцитозина с разрешением в одну пару оснований, было продемонстрировано, что такая обработка посредством dCas9-MQ1/GD-28617 направляет метилирование de novo в целевую область, и что эти транскрипционные изменения тесно коррелируют с процентом метилирования CpG в области-мишени и подтверждают, что метилирование сохраняется до дня 15 (фиг. 8D).

**Пример 8. Обработка с помощью dCas9-MQ1/GD-17 подавляет рост опухоли in vivo**

В данном примере описан анализ in vivo обработки посредством dCas9-MQ1/GD-17 подкожного ксенотрансплантата Hep3B, которая приводит к подавлению роста опухоли по сравнению с контрольными обработками (PBS и/или dCas9/GD-SafeHarbor).

В данном примере эффектор (dCas9-MQ1/GD-17), составленный в LNP (MC3) в концентрации 0,6 мг/мл, доставляли в участки опухоли путем внутриопухолевой инъекции в день 1 и день 7 (20 мкл/мышь) в тестируемой группе животных. Мышам контрольной группы в место опухоли вводили путем инъекции либо PBS, либо контрольный эффектор dCas9/GD-SafeHarbor в LNP в концентрации 0,6 мг/мл (MC3) (20 мкл/мышь). Каждая контрольная и тестируемая группа состояла из 6 животных с ксенотрансплантатами SubQ Hep3B (250 $мм^3$). Изменения объема опухоли для каждой группы измеряли каждые 3 дня в течение 15 дней. По истечении 15 дней изменения среднего объема опухоли измеряли с помощью парного t-критерия и наносили на график. У мышей, которых обрабатывали с помощью dCas9-MQ1/GD-17, наблюдали уменьшение объема опухоли по сравнению с обеими контрольными группами (фиг. 9).

**Пример 9. dCas9-MQ1/GD-17 снижает уровень активности MYC в контексте инфекции гепатита B в гепатоцитах человека**

В данном примере продемонстрировано, что dCas9-MQ1/GD-17 снижает уровень активности MYC в контексте инфекции гепатита B в гепатоцитах человека.

В данном примере клетки, представляющие собой гепатоциты человека, инфицировали посредством HBV, и как неинфицированные, так и инфицированные клетки, представляющие собой гепатоциты, высевали и выращивали в течение 8-дневного периода. По истечении 9 дней у клеток, представляющих собой гепатоциты человека, инфицированные HBV, наблюдали более высокую экспрессию MYC по сравнению с неинфицированными клетками. Как неинфицированные, так и инфицированные посредством HBV клетки, представляющие собой гепатоциты, подвергали трансфекции посредством LNP с контрольным эффектором (dCas9+sgRNA SafeHarbor (GD-SH)) или эффектором dCas9-MQ1/GD-17 и обеспечивали их рост в течение еще 48 часов. Затем

через 48 часов оценивали уровень экспрессии MYC с помощью qPCR (фиг. 8). Исследование проводили в трехкратной биологической повторности. РНК выделяли с помощью набора для 96 луночного планшета Rneasy® Plus (Qiagen) в соответствии с протоколом производителя. Образцы РНК подвергали обратной транскрипции в cDNA с помощью набора LunaScript ® RT SuperMix Kit (NEB) и анализировали с помощью количественной ПЦР (qPCR) (в трех технических повторностях) с применением набора праймеров/зондов TaqMan™, специфичных к MYC, со смесью TaqMan™ Fast Advanced Master Mix (Thermo Scientific). Экспрессию MYC количественно оценивали относительно экспрессии эталонных генов GAPDH с помощью способа ΔΔCt, в качестве калибраторов использовали образцы dCas9+GD-SH.

Уровень экспрессии MYC, оцениваемый с помощью qPCR спустя 48 часов и нормализованный по отношению к неинфицированным контрольным гепатоцитам человека, свидетельствовал, что dCas9-MQ1/GD-17 (промотор) снижает уровень активности MYC в неинфицированных и инфицированных клетках (фиг. 10).

**Пример 10. Комбинация доменов по типу "цинкового пальца" плюс транскрипционные эффекторы, нацеленные на ASMC MYC, снижают экспрессию MYC**

В данном примере продемонстрировано, что нацеливание эффектора KRAB (либо неэффектора или NE), слитого с доменом по типу "цинкового пальца", на вышележащую область, непосредственно смежную с мотивом CTCF (ZF3-NE или ZF3-KRAB), и нацеливание эффектора MQ1, слитого с доменом по типу "цинкового пальца", на промотор MYC (ZF9-MQ1) снижает уровень экспрессии mRNA MYC. Комбинация ZF9-MQ1 и ZF3-KRAB является более эффективной в снижении экспрессии MYC по сравнению с другими эффекторами, протестированными в данном примере, по отдельности или в комбинации.

Эффекторы ZF3-NE или ZF3-KRAB, нацеливающиеся на якорный CTCF, комбинировали с ZF9-MQ1, сконструированным для связывания с промотором MYC и нацеливания на него в линии клеток HCC, Hep3B. В качестве положительных контролей для двух областей использовали dCas-KRAB/GD-28859 и dCas9-MQ1/GD-28617. Отрицательные контроли для данных экспериментов включали необработанные клетки и клетки, трансфицированные посредством ZF5-NE и зеленого флуоресцентного белка (GFP). Эффекторные mRNA доставляли совместно с помощью доставки в LNP с SSOP. Клетки HCC высевали в 96-луночные планшеты в ростовой среде (~5000 клеток/лунка). Затем к клеткам добавляли составы с LNP (0,6 мкг/мл) для обеспечения трансфекции mRNA, затем инкубировали до различных моментов времени. РНК выделяли из трех биологических повторностей с применением набора для 96-луночного планшета Rneasy® Plus (Qiagen) в соответствии с протоколом производителя. Образцы РНК подвергали обратной транскрипции в cDNA с помощью набора LunaScript ® RT SuperMix Kit (NEB) и анализировали с помощью количественной ПЦР (qPCR) (в трех технических повторностях) с применением набора праймеров/зондов TaqMan™, специфичных к MYC,

со смесью TaqMan™ Fast Advanced Master Mix (Thermo Scientific). Экспрессию MYC количественно оценивали относительно экспрессии эталонных генов GAPDH с помощью способа ΔΔCt, в качестве калибраторов использовали необработанные образцы и образцы dCas9 (неэффектора).

Из этих данных видно, что ZF3-KRAB плюс ZF9-MQ1 снижали уровень активности MYC в большей степени, чем dCas9-KRAB/GD-28859, ZF3-KRAB, ZF3-NE, dCas9-MQ1/GD-28617, ZF9-MQ1 отдельно или комбинация ZF3-NE или ZF5-NE плюс ZF9-MQ1 (фиг. 11). Отдельно GFP и ZF5-NE оказывали пренебрежимо малый эффект в отношении экспрессии MYC. Данные были сопоставимы в течение протестированного периода времени (24, 48 и 72 часа) с максимальным подавлением через 24 часа, продолжающимся до по меньшей мере 72 часов.

**Пример 11. Комбинация ZF9-MQ1 и ZF3-KRAB снижает экспрессию MYC в трех моделях HCC**

В данном примере продемонстрировано, что комбинация ZF9-MQ1 и ZF3-KRAB снижает уровень экспрессии mRNA MYC в большей степени в дополнительных линиях клеток HCC (Hep3B, HepG2 и SKHEP1) по сравнению с другими эффекторами, протестированными отдельно или в комбинации.

Эффекторы ZF3-NE или ZF3-KRAB, нацеливающиеся на якорный CTCF, комбинировали с ZF9-MQ1, сконструированным для связывания с промотором MYC и нацеливания на него, в трех линиях клеток HCC: Hep3B, HepG2 и SKHEP1. Отрицательные контроли для данных экспериментов включал клетки, трансфицированные посредством ZF5-NE. Эффекторные mRNA доставляли совместно с помощью доставки в LNP с SSOP. Клетки HCC высевали в 96-луночные планшеты в ростовой среде (~5000 клеток/лунка). Затем к клеткам добавляли составы с LNP (0,6 мкг/мл) для обеспечения трансфекции mRNA, затем инкубировали до различных моментов времени. РНК выделяли из трех биологических повторностей с применением набора для 96-луночного планшета Rneasy® Plus (Qiagen) в соответствии с протоколом производителя. Образцы РНК подвергали обратной транскрипции в cDNA с помощью набора LunaScript ® RT SuperMix Kit (NEB) и анализировали с помощью количественной ПЦР (qPCR) (в трех технических повторностях) с применением набора праймеров/зондов TaqMan™, специфичных к MYC, со смесью TaqMan™ Fast Advanced Master Mix (Thermo Scientific). Экспрессию MYC количественно оценивали относительно экспрессии эталонных генов GAPDH с помощью способа ΔΔCt, в качестве калибраторов использовали необработанные образцы и образцы dCas9 (неэффектора).

Из этих данных видно, что ZF3-KRAB плюс ZF9-MQ1 снижали уровень активности MYC в большей степени, чем ZF9-MQ1 отдельно или комбинация ZF3-NE плюс ZF9-MQ1 (фиг. 12). Данные были сопоставимы в пределах протестированного периода времени (24, 48 и 72 часа).

**Пример 12. Кривые зависимости "доза - ответ" для жизнеспособности и экспрессии MYC для ZF9-MQ1 в дополнительных моделях HCC**

В данном примере описано снижение уровня экспрессии Myc и жизнеспособности клеток с помощью ZF9-MQ1 с использованием кривых зависимости "доза - ответ" в пяти линиях клеток HCC.

В данном примере ZF9-MQ1, сконструированный для связывания с промотором MYC и нацеливания на него, вносили в пять линий клеток HCC, т. е. Hep3B, HepG2, SKHEP1, SNU-182 и SNU-449 (фиг. 13A), в нескольких концентрациях. В качестве отрицательных контролей использовали необработанные клетки. Эффекторную mRNA доставляли с использованием доставки в LNP с SSOP. Клетки HCC высевали в 96-луночные планшеты в ростовой среде (~5000 клеток/лунка). Составы с LNP (начиная с 5 или 0,6 мкг/мл) затем добавляли в каждую из 3 лунок, затем разводили ~1:2 в последующих лунках от 6 до 10 доз для введения посредством трансфекции mRNA, затем инкубировали в течение 72 часов. Для оценки жизнеспособности и уровня РНК собирали планшеты с разными повторностями. Жизнеспособность измеряли с применением набора для анализа Celltiter GLO от Promega в соответствии с протоколом производителя. РНК выделяли из трех биологических повторностей с применением набора для 96-луночного планшета Rneasy® Plus (Qiagen) в соответствии с протоколом производителя. Образцы РНК подвергали обратной транскрипции в cDNA с помощью набора LunaScript ® RT SuperMix Kit (NEB) и анализировали с помощью количественной ПЦР (qPCR) (в трех технических повторностях) с применением набора праймеров/зондов TaqMan™, специфичных к MYC, со смесью TaqMan™ Fast Advanced Master Mix (Thermo Scientific). Экспрессию MYC количественно оценивали относительно экспрессии эталонных генов GAPDH с помощью способа ΔΔCt, в качестве калибраторов использовали необработанные образцы и образцы dCas9 (неэффектора). Значение EC50 рассчитывали по кривой зависимости "доза - ответ".

Из этих данных видно, что ZF9-MQ1 снижает экспрессию MYC и снижает жизнеспособность во всех пяти протестированных линиях клеток HCC. ZF9-MQ1 снижал экспрессию MYC при EC50 в диапазоне от 0,0057 до 0,065 мкг/мл LNP/mRNA, при этом EC50 для эффекта в отношении жизнеспособности находилась в диапазоне от 0,049 до 0,29 мкг/мл in vitro спустя 72 часа в данных пяти линиях клеток HCC (фиг. 13B-F).

**Пример 13. Эффективность ZF9-MQ1 in vivo в модели Hep 3B, выращенной подкожно у бестимусных мышей**

В данном примере продемонстрировано, что обработка посредством ZF9-MQ1 подавляла рост опухолей Hep 3B, развившихся у самок бестимусных мышей.

Опухолевые клетки Hep 3B имплантировали в левый бок тридцати самкам бестимусных мышей для индукции развития опухоли. Измеряли изменения объема опухоли и начинали обработку при достижении среднего объема опухоли примерно 100-150 мм$^3$. Мышей разделяли на группы обработки и контрольную группу таким образом, чтобы значения среднего объема опухоли в каждой группе были примерно равными. Контрольным группам вводили путем инъекции либо PBS, либо MYCi975, низкомолекулярный препарат сравнения. Мышам в каждой группе вводили путем

инъекции внутрь опухоли PBS (раз в 5 дней для 3 доз, затем переходили на IV введение для 2 доз), внутривенно ZF9-MQ1 (раз в 5 дней в дозе 3 мг/кг) или внутрибрюшинно MYCi975 (один раз в сутки в течение 5 дней/недели). Всех животных ежедневно взвешивали и визуально оценивали. Изменения объема опухоли для каждой группы измеряли 3 раза в неделю. В течение 22 дней изменения веса тела по сравнению с исходным уровнем и средний объем опухоли измеряли с использованием парного t-критерия и наносили на график (фиг. 14A-B).

Из результатов видно, что ZF9-MQ1 был способен значимо снижать рост опухоли (начиная с дня 6) по сравнению с мышами, обработанными контролем в виде PBS. ZF9-MQ1 снижал рост опухоли в большей степени, чем низкомолекулярный препарат сравнения (MYCi975) (фиг. 14A). Кроме того, по результатам IHC-окрашивания через 48 часов после последней дозы была видна экспрессия полипептида ZF9-MQ1, снижение экспрессии MYC и снижение пролиферации, измеренное с помощью Ki67 (данные не представлены). ZF9-MQ1 оказывал минимальный эффект в отношении общего веса животного (фиг. 14B).

**Пример 14. Эффективность ZF9-MQ1+ZF3-KRAB in vivo в модели Hep 3B, выращенной ортотопически у мышей Fox Chase CB17 SCID**

В данном примере продемонстрирована долгосрочная противоопухолевая эффективность и устойчивость бицистронных ZF9-MQ1+ZF3-KRAB после введения дозы в ортотопической модели Hep3B-luc у самок мышей Fox Chase CB17 SCID.

Клетки Hep-3B-luc вводили путем инъекции мышам SCID в верхнюю левую долю печени. Среднее значение ассоциированной с опухолью биолюминесценции всего тела (TABL) в проекции снизу для каждой группы на этапе рандомизации составляло ~ 2,8×109 фотонов в секунду. Мышей рандомно распределяли на две группы по 12 мышей в каждой для обработки посредством PBS и ZF9-MQ1+ZF3-KRAB и одну группу из 6 мышей для обработки сорафенибом в день 7 после имплантации клеток. Обработку начинали в день 8 после имплантации опухолевых клеток (обозначен как день 1 введения дозы на графике). Мышей обрабатывали посредством внутривенного введения PBS (раз в 5 дней для 4 доз, затем раз в 3 дня для 2 доз), внутривенно посредством LNP (MC3) ZF9-MQ1+ZF3-KRAB (1,5 мг/кг раз в 5 дней для 2 доз, 3 мг/кг раз в 5 дней для 3 доз, 3 мг/кг раз в 3 дня для 1 дозы), перорально сорафенибом (50 мг/кг в сутки). Всех животных ежедневно взвешивали и визуально оценивали. Размер опухоли измеряли с помощью биолюминесценции 2 раза в неделю.

Из результатов видно, что обработка посредством ZF9-MQ1+ZF3-KRAB значимо снижала рост опухоли (начиная с дня 21) по сравнению с мышами, которых обрабатывали контролем в виде PBS. Обеспечиваемое ZF9-MQ1+ZF3-KRAB снижение роста опухоли было сравнимо с таковым в случае сорафениба (фиг. 15A). Обработка посредством ZF9-MQ1+ZF3-KRAB оказывала минимальный эффект в отношении общего веса животного (фиг. 15B).

**Пример 15. Эффективность ZF9-MQ1 и составленных вместе ZF9-MQ1+ZF3-**

**KRAB in vivo в модели Hep 3B, выращенной подкожно у бестимусных мышей**

В данном примере продемонстрировано, что ZF9-MQ1 и составленные вместе ZF9-MQ1+ZF3-KRAB способны подавлять рост опухолей Hep 3B дозозависимым образом у самок бестимусных мышей.

Опухолевые клетки Hep 3B имплантировали в левый бок семидесяти двум самкам бестимусных мышей для индукции развития опухоли. Измеряли изменения объема опухоли и начинали обработку при достижении среднего объема опухоли примерно 200 $мм^3$. Мышей разделили на девять групп обработки (по 8 мышей в каждой) таким образом, чтобы значения среднего объема опухоли в каждой группе были примерно равными. Мышам в каждой группе внутривенно вводили путем инъекции PBS (раз в 5 дней для 3 доз, затем раз в 3 дня для 3 доз), ZF9-MQ1 в дозах 1 мг/кг и 3 мг/кг (раз в 5 дней для 3 доз, затем раз в 3 дня для 3 доз), составленные вместе ZF9-MQ1+ZF3-KRAB в дозах 1 мг/кг и 3 мг/кг (раз в 5 дней для 3 доз, затем раз в 3 дня для 3 доз), mRNA, представляющую собой отрицательный контроль, в дозе 1 мг/кг и 3 мг/кг (раз в 5 дней для 3 доз, затем раз в 3 дня для 3 доз), внутрибрюшинно MYCi975 в дозе 100 мг/кг (один раз в сутки в течение 5 дней в неделю) или внутрибрюшинно цисплатин в дозе 1 мг/кг (один раз в 15 дней). Всех животных ежедневно взвешивали и визуально оценивали. Изменения объема опухоли измеряли 3 раза в неделю.

Из результатов видно, что ZF9-MQ1 отдельно и комбинация ZF9-MQ1 и ZF3-KRAB в дозе 1 мг/кг были способны снижать рост опухоли по сравнению с мышами, которых обрабатывали отрицательным контролем (фиг. 16A). Дополнительно, ZF9-MQ1 отдельно (начиная с дня 13) и комбинация в виде составленных вместе ZF9-MQ1+ZF3-KRAB (начиная с дня 6) в дозе 3 мг/кг были способны значимо снижать рост опухоли по сравнению с мышами, которых обрабатывали отрицательным контролем (фиг. 16B). Составленные вместе ZF9-MQ1 и ZF3-KRAB были способны снижать рост опухоли на таком же или более высоком уровне, что и цисплатин или низкомолекулярный препарат сравнения (MYCi975) как при дозе 1 мг/кг, так и при дозе 3 мг/кг. Составленные вместе ZF9-MQ1 +/- ZF3-KRAB оказывали минимальный эффект в отношении общего веса животного по сравнению как с цисплатином, так и с MYCi975 в дозировках 1 мг/кг и 3 мг/кг (фиг. 16C-D).

**Пример 16. Комбинация доменов по типу "цинкового пальца" плюс ДНК-метилтрансферазы, нацеленной на изолированный геномный домен (IGD) MYC, снижает экспрессию MYC и снижает жизнеспособность клеток в различных линиях раковых клеток легкого**

В данном примере продемонстрировано, что снижение уровня экспрессии mRNA Myc1 путем нацеливания эффектора MQ1, слитого с доменом по типу "цинкового пальца", на промотор MYC (ZF9-MQ1) в линиях NSCLC (A549, NCI-H2009, NCI-H358HCC95) приводит к потере жизнеспособности клеток в многочисленных линиях раковых клеток легкого.

ZF9-MQ1, сконструированный для связывания с промотором MYC и нацеливания

на него в линиях раковых клеток легкого, доставляли вместе с отрицательными контролями, которые включали необработанные клетки и клетки, трансфицированные зеленым флуоресцентным белком (GFP). Молекулы mRNA, кодирующие либо ZF9-MQ1, либо GFP, доставляли с использованием доставки в LNP с SSOP, как описано выше в примерах 12 и 14. Раковые клетки легкого высевали в 96-луночные планшеты в ростовой среде (~10000 клеток/лунка). Затем к клеткам добавляли составы с LNP (1 мкг/мл) для введения посредством трансфекции mRNA, затем инкубировали в течение 72 часов и 120 часов соответственно. Для определения изменения жизнеспособности и экспрессии mRNA собирали планшеты с разными повторностями.

Жизнеспособность измеряли с применением набора для анализа CellTiter-GLO® от Promega в соответствии с протоколом производителя. РНК выделяли из трех биологических повторностей с применением набора для 96-луночного планшета Rneasy® Plus (Qiagen) в соответствии с протоколом производителя. Образцы РНК подвергали обратной транскрипции в cDNA с помощью набора LunaScript ® RT SuperMix Kit (NEB) и анализировали с помощью количественной ПЦР (qPCR) (в трех технических повторностях) с применением набора праймеров/зондов TaqMan™, специфичных к MYC, со смесью TaqMan™ Fast Advanced Master Mix (Thermo Scientific). Экспрессию MYC количественно оценивали относительно экспрессии эталонных генов GAPDH с помощью способа ΔΔCt, в качестве калибраторов использовали необработанные образцы.

Из этих данных видно, что ZF9-MQ1 способен снижать уровни mRNA MYC на >80% в четырех линиях раковых клеток легкого, и это совпало со значительной потерей жизнеспособности клеток рака легкого во всех четырех линиях клеток (фиг. 17A-H).

**Пример 17. ZF9-MQ1 индуцирует клеточный апоптоз в линии клеток NSCLC NCI-H2009**

В данном примере продемонстрирован эффект ZF9-MQ1, оказываемый на клеточный апоптоз раковых клеток легкого.

Анализы жизнеспособности, такие как Cell Titer GLO (используемый в примере 16), позволяют измерять жизнеспособность путем определения относительного количества клеток, оставшихся в лунке, исходя из уровней АТФ. Данные анализы не позволяют провести различие между потерей пролиферации клеток и различными типами гибели клеток (например, некроптозом и апоптозом).

Для определения количества апоптотических клеток после трансфекции ZF9-MQ1 использовали меченные флуоресцентной меткой антитела к белку, представляющему собой аннексин V, и окрашивание ядер йодидом пропидия (PI). В качестве отрицательного контроля в дополнение к необработанным клеткам, использовали mRNA, кодирующую домен по типу "цинкового пальца" ZF9 без эффекторного белка (ZF9-NE). Линию клеток легкого NCI-H2009 высевали в 12-луночный планшет в ростовой среде (50000 клеток на лунку). Затем к клеткам добавляли составы с LNP с mRNA (1 мкг/мл) для введения посредством трансфекции mRNA ZF9-MQ1 или ZF9-NE, после чего инкубировали в течение 96 часов. Клетки собирали и окрашивали с помощью набора для

обнаружения апоптоза с помощью аннексина V и FITC от BD (BDB556570) и анализировали методом проточной цитометрии. Клетки, положительные по аннексину V-FITC и PI, классифицировали как апоптозные.

Из этих данных видно, что через 96 часов в отрицательном контроле (клетки, обработанные посредством ZF9-NE, и необработанные клетки) лишь 18% клеток были апоптозными (фиг. 18A-B, 18D). В отличие от этого, в культуре NCI-H2009, обработанной с помощью ZF9-MQ1, апоптозными были 40% клеток (фиг. 18C-D). Это указывает на то, что ZF9-MQ1 может вызывать клеточный апоптоз раковых клеток легкого.

**Пример 18. Кривые зависимости "доза - ответ" для жизнеспособности и экспрессии MYC для ZF9-MQ1 в дополнительных линиях клеток NSCLC**

В данном примере продемонстрировано, что ZF9-MQ1 снижает уровень экспрессии MYC1 и жизнеспособность клеток в линиях клеток NSCLC дозозависимым образом.

ZF9-MQ1, сконструированный для связывания с промотором MYC и нацеливания на него, вносили в две линии клеток NSCLC, т. е. A549 и HCC95, в нескольких концентрациях. В качестве отрицательного контроля использовали необработанные клетки. Эффекторные mRNA доставляли с помощью доставки в LNP с SSOP. Раковые клетки легкого высевали в 96-луночные планшеты в ростовой среде (~10000 клеток/лунка). Составы с LNP (начиная с 5 мкг/мл) затем добавляли в каждую из 3 лунок, затем разводили ~1:2 в последующих лунках для получения 10 доз для трансфекции mRNA и инкубировали в течение 72 часов. Для определения изменения жизнеспособности и экспрессии mRNA собирали планшеты с разными повторностями.

Жизнеспособность измеряли с применением набора для анализа CellTiter-GLO® от Promega в соответствии с протоколом производителя. РНК выделяли из трех биологических повторностей с применением набора для 96-луночного планшета Rneasy® Plus (Qiagen) в соответствии с протоколом производителя. Образцы РНК подвергали обратной транскрипции в cDNA с помощью набора LunaScript ® RT SuperMix Kit (NEB) и анализировали с помощью количественной ПЦР (qPCR) (в трех технических повторностях) с применением набора праймеров/зондов TaqMan™, специфичных к MYC, со смесью TaqMan™ Fast Advanced Master Mix (Thermo Scientific). Экспрессию MYC количественно оценивали относительно экспрессии эталонных генов GAPDH с помощью способа ΔΔCt, в качестве калибраторов использовали необработанные образцы и образцы dCas9 (неэффектора).

Из данных видно, что ZF9-MQ1 снижал уровень активности MYC с EC50, составляющей 0,08 мкг/мл LNP/mRNA, при этом EC50 для эффекта в отношении жизнеспособности являлась в ~25 раз выше (2 мкг/мл) in vitro через 72 часа как у A549, так и у HCC95 (фиг. 19A-B).

**Пример 19. ZF9-MQ1 снижает уровни белка MYC более чем на 80% в линии клеток NSCLC NCI-H2009**

В данном примере продемонстрировано изменение уровня белка MYC в ответ на обработку посредством ZF9-MQ1 с помощью методики иммуноблоттинга.

ZF9-MQ1, сконструированный для связывания с промотором MYC и нацеливания на него в линиях раковых клеток легкого, доставляли вместе с отрицательными контролями ZF9-NE и необработанными клетками. Линию клеток легкого NCI-H2009 высевали в 12-луночный планшет в ростовой среде (50000 клеток на лунку). Затем к клеткам добавляли составы с LNP (1 мкг/мл) для введения посредством трансфекции mRNA ZF9-MQ1 или ZF9-NE, после чего инкубировали в течение 96 часов. Затем клетки лизировали в RIPA-буфере и количественно оценивали уровни белка с помощью анализа белка Pierce BCA (23225). Для каждого образца загружали равные количества белка и разделяли по размеру с помощью системы для минигелей NuPAGE™ (Thermo Fisher). Затем белок переносили на мембрану из PVDF с помощью устройства для переноса геля iBlot™ 2 (Thermo Fisher). Мембраны обрабатывали в течение ночи антителом к MYC от ABCAM (ab32072). В качестве контроля загрузки использовали антитело к актину Cell Signaling (8H10D10). Затем сигнал визуализировали и количественно оценивали с помощью системы для визуализации LI-COR с применением флуоресцентных вторичных антител к видам антител к MYC и актину.

Из данных видно, что обработка посредством ZF9-MQ1 снижает уровни белка MYC более чем на 80% через 96 часов после обработки в линиях раковых клеток легкого (фиг. 20A-B), что сравнимо со снижением уровня экспрессии mRNA (пример 17).

**Пример 20. Эффективность ZF9-MQ1 in vivo в модели NCI-H2009, выращенной подкожно у бестимусных мышей**

В данном примере продемонстрировано, что ZF9-MQ1 подавляет рост опухолей NCI-H2009, развившихся у самок бестимусных мышей.

Развитие заболевания вызывали у самок бестимусных мышей путем имплантации в левый бок опухолевых клеток NCI-H2009. Обработку начинали при достижении среднего объема опухоли примерно 100-150 мм$^3$. Мышей разделяли на группы обработки таким образом, чтобы значения среднего объема опухоли в каждой группе были примерно равными. mRNA доставляли в LNP с MC3. Мышам внутривенно вводили путем инъекции ZF9-MQ1 или некодирующую mRNA в LNP с MC3 в дозе 3 мг/кг или PBS (один раз в 5 дней для 4 доз, затем один раз в 3 дня для 3 доз; всего мышам вводили 7 доз). Всех животных ежедневно взвешивали и визуально оценивали. Размеры опухолей измеряли 3 раза в неделю.

Из результатов видно, что ZF9-MQ1 был способен значимо снижать рост опухоли (начиная с дня 8) по сравнению с мышами, которых обрабатывали контролем в виде PBS (фиг. 21). ZF9-MQ1 оказывал минимальный эффект в отношении общего веса животного.

**Пример 21. Комбинация направляющих РНК и репрессоров транскрипции (посредством dCas9), нацеленных на суперэнхансер IGD MYC, снижает экспрессию MYC при применении в LNP с SSOP**

В данном примере продемонстрировано, что экспрессия mRNA MYC снижается, когда специфичный для легких суперэнхансер, который регулирует экспрессию MYC в линии клеток A549, подвергается целенаправленному действию со стороны эффекторных

белков KRAB.

Направляющие РНК (таблица 13) были сконструированы в отношении области суперэнхансера легкого и протестированы в комбинации с белком-репрессором KRAB, конъюгированным с ферментативно "мертвой" CAS9. Эффекторную mRNA и направляющие РНК совместно доставляли с помощью доставки в LNP с SSOP с доставкой mRNA GFP в качестве отрицательного контроля. Линию клеток NCSLC A549 высевали в 96-луночные планшеты в ростовой среде (~10000 клеток/лунка). Затем к клеткам добавляли составы с LNP (2,5 мкг/мл) для введения посредством трансфекции mRNA/направляющей РНК, после чего инкубировали в течение 72 часов. РНК выделяли из трех биологических повторностей с применением набора для 96-луночного планшета Rneasy® Plus (Qiagen) в соответствии с протоколом производителя. Образцы РНК подвергали обратной транскрипции в cDNA с помощью набора LunaScript ® RT SuperMix Kit (NEB) и анализировали с помощью количественной ПЦР (qPCR) (в трех технических повторностях) с применением набора праймеров/зондов TaqMan™, специфичных к MYC, со смесью TaqMan™ Fast Advanced Master Mix (Thermo Scientific). Экспрессию MYC количественно оценивали относительно экспрессии эталонных генов GAPDH с помощью способа ΔΔCt, в качестве калибраторов использовали необработанные образцы.

Таблица 13. Направляющие

| **Название направляющей** | **Последовательность-мишень** | **Координаты в геноме** |
|---|---|---|
| GD-29833 | TGCCACTTCCCCACTAACCC (SEQ ID NO: 96) | GRCh37: chr8:129188878-129188900 |
| GD-29834 | GGCCACACAAGGAAGCTGCA (SEQ ID NO: 97) | GRCh37: chr8:129188958-129188980 |
| GD-29835 | CCACACAAGGAAGCTGCAGG (SEQ ID NO: 98) | GRCh37: chr8:129188960-129188982 |
| GD-29836 | TGATTGGAATGCAACCCGAA (SEQ ID NO: 99) | GRCh37: chr8:129189067-129189089 |
| GD-29837 | TTTTGCCCTTGCTACCCCAA (SEQ ID NO: 100) | GRCh37: chr8:129189457-129189479 |
| GD-29838 | AGCTGATGGTATCCACTAGG (SEQ ID NO: 101) | GRCh37: chr8:129189554-129189576 |
| GD-29839 | CACATCCAAGAATGTAGTGG (SEQ ID NO: 102) | GRCh37: chr8:129189679-129189701 |
| GD-29840 | GATACAGCCACAAAGCTCAC (SEQ ID NO: 103) | GRCh37: chr8:129209511-129209533 |

| | | |
|---|---|---|
| GD-29841 | ATTACATAACAGAATCCAGG (SEQ ID NO: 104) | GRCh37: chr8:129209643-129209665 |
| GD-29842 | CCCTTGACTGTGCTGCCACC (SEQ ID NO: 105) | GRCh37: chr8:129209658-129209680 |
| GD-29843 | CAGACGAGGAACCTGAACCC (SEQ ID NO: 106) | GRCh37: chr8:129209856-129209878 |
| GD-29844 | AGAATCCCTTGGGGTAGCAA (SEQ ID NO: 107) | GRCh37: chr8:129189452-129189474 |
| GD-29914 | CAGCACTCTCGCTGACCGCA (SEQ ID NO: 108) | GRCh37: chr8:129189190-129189212 |
| GD-29915 | GTTGAGTCATGTGTACTCTG (SEQ ID NO: 109) | GRCh37: chr8:129189274-129189296 |
| GD-29916 | AGGAACAGGATGTTACAACT (SEQ ID NO: 110) | GRCh37: chr8:129189421-129189443 |
| GD-28662 | GGGGCCACTAGGGACAGGAT (SEQ ID NO: 111) | GRCh37: chr19:55627120-55627139 |

Из этих данных видно, что направляющая РНК GD-29833 и 29914 может снижать уровни mRNA MYC при доставке с эффекторной mRNA dCAS9-KRAB, что подтверждает возможность снижения уровня онкогенного MYC при применении данного дистального регуляторного элемента (фиг. 22).

**Пример 22. Комбинация направляющих РНК и репрессоров транскрипции (dCas9), нацеленных на суперэнхансер IGD MYC, снижает экспрессию MYC при применении в LNP с MC3**

В данном примере описано снижение экспрессии mRNA MYC путем нацеливания эффекторных белков KRAB на специфический для легких суперэнхансер, который регулирует экспрессию MYC, с использованием альтернативного липида MC3 (по сравнению с SSOP в примере 21).

Направляющие РНК (таблица 13) были сконструированы в отношении области суперэнхансера легкого и протестированы в комбинации с белком-репрессором KRAB, конъюгированным с ферментативно "мертвой" CAS9. Эффекторную mRNA и направляющие РНК совместно доставляли с помощью доставки в LNP с MC3 с доставкой mRNA GFP в качестве отрицательного контроля. Линию клеток NCSLC A549 высевали в 96-луночные планшеты в ростовой среде (~10000 клеток/лунка). Затем к клеткам добавляли составы с LNP (2,5 мкг/мл) для введения посредством трансфекции mRNA/направляющей РНК, после чего инкубировали в течение 72 часов. РНК выделяли из трех биологических повторностей с применением набора для 96-луночного планшета Rneasy® Plus (Qiagen) в соответствии с протоколом производителя. Образцы РНК

подвергали обратной транскрипции в cDNA с помощью набора LunaScript ® RT SuperMix Kit (NEB) и анализировали с помощью количественной ПЦР (qPCR) (в трех технических повторностях) с применением набора праймеров/зондов TaqMan™, специфичных к MYC, со смесью TaqMan™ Fast Advanced Master Mix (Thermo Scientific). Экспрессию MYC количественно оценивали относительно экспрессии эталонных генов GAPDH с помощью способа ΔΔCt, в качестве калибраторов использовали необработанные образцы.

Из этих данных видно, что направляющая РНК GD-29833 и 29914 может снижать уровни mRNA MYC при доставке с эффекторной mRNA dCAS9-KRAB, что подтверждает возможность снижения уровня онкогенного MYC при применении данного дистального регуляторного элемента (фиг. 23). Данный эффект наблюдался как при трансфекции с SSOP (пример 21), так и при трансфекции с липидом MC3 (пример 22).

**Пример 23. Комбинация направляющих РНК и репрессоров транскрипции (dCas9), нацеленных на суперэнхансер IGD MYC, снижает экспрессию MYC в NSCLC**

В данном примере описано снижение экспрессии mRNA MYC путем нацеливания различных тринскрипционных эффекторных белков (EZH2, EZH2-KRAB или MQ1) на специфичный для легких суперэнхансер, который регулирует экспрессию MYC.

Направляющие РНК (GD-29833 и GD-29914), нацеленные на суперэнхансер MYC, тестировали в комбинации с белками-репрессорами, в том числе гистонметилтрансферазой EZH2 (отдельно или в сочетании с KRAB) и ДНК-метилтрансферазой MQ1, конъюгированной с ферментативно "мертвой" CAS9. Эффекторную mRNA и направляющие РНК совместно доставляли с помощью доставки в LNP с SSOP с доставкой mRNA GFP в качестве отрицательного контроля. Линии клеток NCSLC A549 или NCI-H2009 высевали в 96-луночные планшеты в ростовой среде (~10000 клеток/лунка). Затем к клеткам добавляли составы с LNP (2,5 мкг/мл) для введения посредством трансфекции mRNA/направляющей РНК, после чего инкубировали в течение 72 часов. РНК выделяли из трех биологических повторностей с применением набора для 96-луночного планшета Rneasy® Plus (Qiagen) в соответствии с протоколом производителя. Образцы РНК подвергали обратной транскрипции в cDNA с помощью набора LunaScript ® RT SuperMix Kit (NEB) и анализировали с помощью количественной ПЦР (qPCR) (в трех технических повторностях) с применением набора праймеров/зондов TaqMan™, специфичных к MYC, со смесью TaqMan™ Fast Advanced Master Mix (Thermo Scientific). Экспрессию MYC количественно оценивали относительно экспрессии эталонных генов GAPDH с помощью способа ΔΔCt, в качестве калибраторов использовали необработанные образцы.

Из этих данных видно, что направляющая РНК GD-29833 и 29914 может эффективно снижать уровни mRNA MYC при доставке со всеми 3 протестированными эффекторными белками (EZH2, EZH2-KRAB и MQ1) в 2 различных линиях клеток NSCLC (A549 и NCI-H2009) (фиг. 24A-B).

**Пример 24. Комбинация направляющих РНК и репрессоров транскрипции**

**(dCas9), нацеленных на суперэнхансер IGD MYC, дополнительно снижает экспрессию MYC в NSCLC через 120 часов**

В данном примере продемонстрировано повышенное снижение экспрессии mRNA MYC, наблюдаемое через 120 часов после трансфекции нацеленными на суперэнхансер направляющими молекулами с эффекторными белками KRAB или MQ1 в линиях раковых клеток легкого (A549 и NCI-H2009).

Направляющие РНК, нацеленные на суперэнхансер MYC, тестировали в комбинации с белком-репрессором KRAB или ДНК-метилтрансферазой MQ1. Эффекторную mRNA и направляющие РНК совместно доставляли с помощью доставки в LNP с SSOP с доставкой mRNA GFP в качестве отрицательного контроля. Линии клеток NCSLC A549 или NCI-H2009 высевали в 12-луночные планшеты в ростовой среде (~50000 клеток/лунка). Затем к клеткам добавляли составы с LNP (2,5 мкг/мл) для введения посредством трансфекции mRNA/направляющей РНК, после чего инкубировали в течение 120 часов. РНК выделяли из трех биологических повторностей с применением набора для 96-луночного планшета Rneasy® Plus (Qiagen) в соответствии с протоколом производителя. Образцы РНК подвергали обратной транскрипции в cDNA с помощью набора LunaScript ® RT SuperMix Kit (NEB) и анализировали с помощью количественной ПЦР (qPCR) (в трех технических повторностях) с применением набора праймеров/зондов TaqMan™, специфичных к MYC, со смесью TaqMan™ Fast Advanced Master Mix (Thermo Scientific). Экспрессию MYC количественно оценивали относительно экспрессии эталонных генов GAPDH с помощью способа ΔΔCt, в качестве калибраторов использовали необработанные образцы.

Из этих данных видно, что направляющая РНК GD-29833 и 29914, доставляемая с KRAB или MQ1, может значимо снижать уровни mRNA MYC в 2 линиях клеток NSCLC через 120 часов (A549 и NCI-H2009) (фиг. 25A-B). Более того, наблюдаемое снижение уровня активности сравнимо с таковым, наблюдаемым при обработке посредством ZF9-MQ1 в NCI-H2009 (фиг. 25B).

**Пример 25. Направление dCAS9-MQ1 на суперэнхансер MYC приводит к повышенному метилированию ДНК в сайте-мишени суперэнхансера и в промоторной области MYC**

В данном примере продемонстрировано, что dCas9-MQ1 может быть направлен на суперэнхансер MYC, что приводит к метилированию сайта-мишени и промоторной области MYC.

Систему CRISPR-dCas9 модифицировали путем связывания ее с эпигенетическим репрессором: MQ1. Данные молекулы модулируют репрессию транскрипции, метилируя CpG-нуклеотиды ДНК. Эффекторную mRNA и направляющие на суперэнхансер РНК (29833 и 29914) доставляли совместно с помощью доставки в LNP с SSOP с доставкой mRNA GFP или конструкции dCAS9-без эффектора (dCas9-NE) в качестве отрицательного контроля. Линию клеток NCSLC NCI-H2009 высевали в 6-луночные планшеты в ростовой среде (~100000 клеток/лунка). Затем к клеткам добавляли составы с LNP (2,5 мкг/мл) для

введения посредством трансфекции mRNA/направляющей РНК, после чего инкубировали в течение 72 часов. ДНК выделяли с применением набора для выделения ДНК Lucigen QuickExtract™, а метилированные области определяли с помощью нацеленного секвенирования с использованием бисульфита для промоторных и суперэнхансерных областей.

В данных исследованиях продемонстрировано, что dCas9-MQ1 увеличивал метилирование сайта-мишени в NSCLC на 60%, а также направлял метилирование в дистальную промоторную область (увеличение приблизительно до 50%) (фиг. 26A-B).

**Пример 26. Комбинация направляющих РНК и репрессоров транскрипции (посредством "мертвого" CAS9), нацеленных на суперэнхансер IGD MYC, снижает уровни белка MYC в линии клеток NSCLC NCI-H2009**

В данном примере продемонстрировано изменение уровней белка MYC путем нацеливания направляющих РНК на суперэнхансер MYC в клетках NSCLC с помощью методики иммуноблоттинга.

GD-29833, сконструированный для связывания с промотором MYC и нацеливания на него в линиях раковых клеток легкого, доставляли совместно с эффекторной mRNA dCAS9-KRAB или dCAS9-MQ1. Линию клеток легкого NCI-H2009 высевали в 12-луночный планшет в ростовой среде (50000 клеток на лунку). Затем к клеткам добавляли составы с LNP (1 мкг/мл) для введения посредством трансфекции направляющих и эффекторных mRNA, после чего инкубировали в течение 96 часов. В качестве отрицательного контроля использовали конструкцию dCAS9-без эффектора (dCAS9-NE). Затем клетки лизировали в RIPA-буфере и количественно оценивали уровни белка с помощью анализа белка Pierce BCA (23225). Для каждого образца загружали равные количества белка и разделяли по размеру с помощью системы для минигелей NuPAGE™ (Thermo Fisher). Затем белок переносили на мембрану из PVDF с помощью устройства для переноса геля Invitrogen iBlot™ 2 (Thermo Fisher). Мембраны обрабатывали в течение ночи антителом к MYC от ABCAM (ab32072). В качестве контроля загрузки использовали антитело к актину Cell Signaling (8H10D10). Затем сигнал визуализировали и количественно оценивали с помощью системы для визуализации LI-COR с применением флуоресцентных вторичных антител к видам антител к MYC и актину.

Из этих данных видно, что направление направляющих молекул на суперэнхансер легкого MYC с репрессорами транскрипции снижает уровни белка MYC до 50% через 96 часов в линиях раковых клеток легкого NCI-H2009 (фиг. 27A-B), что сравнимо со снижением уровня экспрессии mRNA (пример 16).

**Пример 27. Присутствие белка ZF9-MQ1 в лизате цельных клеток коррелирует со снижением уровня белка MYC в линии клеток Hep3B**

В данном примере описано определение изменения уровня экспрессии белка ZF9-MQ1 и MYC с течением времени в клетках Hep 3B после обработки посредством ZF9-MQ1.

Уровни экспрессии белка ZF9-MQ1 и MYC оценивали (методом вестерн-

блоттинга) через 6, 16 и 48 часов после обработки посредством ZF9-MQ1, при этом LNP удаляли, а среду заменяли через 24 часа после начала обработки. Белок экстрагировали с помощью RIPA-буфера, а общий белок количественно оценивали с помощью анализа BCA (Thermo Fisher). Общий белок анализировали на Bis-Tris-гелях NuPAGE™ (Thermo Fisher) с использованием подвижного буфера MOPS и переносили с помощью устройства для переноса с геля iBlot™ 2 (Thermo Fisher).

Вестерн-блоттинг MYC: антитело к β-актину окрашивали вторичным антителом, меченным флуорофором, который характеризуется испусканием при длине волны 594 нм, и антитело к MYC (Abcam) окрашивали вторичным антителом, меченным флуорофором, который характеризуется испусканием при длине волны 488 нм. Систему для визуализации Odyssey® CLx (LI-COR), в которой используется флуоресценция в ближней инфракрасной области спектра (NIR), использовали для получения изображений белков, которые использовались для количественной оценки с помощью программного обеспечения LI-COR. Из площади под кривой (AUC) для каждой полосы MYC и актина вычитали фоновую площадь, затем все нормализовали к отрицательному контролю для каждого момента времени.

Вестерн-блоттинг ZF9-MQ1 (контрольного белка, меченного эпитопом гемагглютинина [HA]): антитело к β-актину окрашивали вторичным антителом, меченным флуорофором, который характеризуется испусканием при длине волны 594 нм, а антитело к HA окрашивали вторичным антителом, меченным флуорофором, который характеризуется испусканием при длине волны 488 нм. Систему для визуализации Odyssey® CLx (LI-COR), в которой используется флуоресценция в NIR, использовали для получения изображений белков, которые использовались для количественной оценки с помощью программного обеспечения LI-COR. Для AUC для каждой полосы HA и актина вычитали фоновую площадь, затем все нормализовали к отрицательному контролю для каждого момента времени.

Из данных видно снижение как присутствия белка ZF9-MQ1, так и уровня экспрессии белка MYC в лизате цельных клеток после обработки клеток посредством ZF9-MQ1 (фиг. 28A-B), и присутствие белка ZF9-MQ1 в лизате целых клеток коррелирует со снижением уровня белка MYC (фиг. 28C).

**Пример 28. Продолжительность снижения уровня экспрессии MYC и статус метилирования**

В данном эксперименте оценивают устойчивость снижения экспрессии MYC после обработки посредством ZF9-MQ1. Кроме того, в данном эксперименте продемонстрирована и оценена корреляция экспрессии MYC с повышенным уровнем метилирования ДНК в локусе-мишени.

Для оценки устойчивости ответа использовали линию клеток SKHEP-1, которая демонстрировала минимальные изменения жизнеспособности, но при этом характеризовалась снижением уровня активности MYC на 40-50% (пример 4). SK-HEP-1 подвергали трансфекции посредством LNP/ZF9-MQ1 или ZF-без эффектора

(отрицательный контроль), а затем, через 24 часа после обработки, заменяли на новую среду. В обозначенные моменты времени клетки собирают для экстракции mRNA и геномной ДНК (набор Qiagen RNA/DNA). Для оценки уровня mRNA MYC всю клеточную РНК обрабатывали для получения комплементарной ДНК (cDNA) (с применением поли-A-праймера), которую затем использовали для анализа методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (RT-PCR) с применением зондов TaqMan™ (Thermo Fisher), специфичных к транскриптам mRNA MYC человека. Для оценки статуса метилирования в локусах-мишенях применяли нацеленное секвенирование генома с использованием бисульфита для измерения уровня 5-метилцитозина с разрешением в одну пару оснований ДНК.

в день 3 уровень mRNA MYC снижался на 89% по сравнению с отрицательным контролем (ZF-без эффектора) и необработанными клетками (не представлено). Снижение уровня экспрессии mRNA медленно возрастало, при этом 45% снижение уровня транскрипта MYC сохранялось и в день 15 (фиг. 29A). Кроме того, экспрессия ZF9-MQ1 направляла метилирование CpG de novo к промоторной области MYC. Транскрипционные изменения MYC коррелировали с процентом метилирования до дня 15 (фиг. 29B).

**Пример 29. Экспрессия C-MYC и жизнеспособность клеток с бицистронной ZF9-MQ1_ZF3-KRAB на первичных гепатоцитах**

В данном примере оценивают влияние бицистронной ZF9-MQ1_ZF3-KRAB на уровень mRNA MYC и жизнеспособность первичных гепатоцитов.

Обеспечивали размораживание криоконсервированных первичных гепатоцитов человека (Lonza) и вносили их в предварительно нагретую среду для размораживания, а через 24 часа высевали. Клетки ресуспендировали в среде для посева и подсчитывали для получения конкретной концентрации (106 клеток/мл). Затем пятьдесят (50) мкл раствора клеток вносили в 96-луночные планшеты (с дополнительными 50 мкл среды для посева) до общего объема 100 мкл и инкубировали в течение ночи. mRNA в составе LNP (GFP, ZF-NE, ZF9-MQ1, ZF3-KRAB, ZF9-MQ1+ZF3-KRAB или бицистронная ZF9-MQ1_ZF3-KRAB) добавляли к клеткам в 100 мкл вспомогательной среды в концентрации 0,6 мкг/мл, 1,25 мкг/мл и 2,5 мкг/мл. Клетки инкубировали в течение 72 часов, при этом замену поддерживающей среды осуществляли начиная с 6 часов и затем ежедневно. Уровни экспрессии mRNA MYC (по результатам RT-PCR) и жизнеспособность клеток (CellTiter-GLO®) оценивали через 72 часа после обработки.

Первичные гепатоциты, обработанные посредством ZF9-MQ1, ZF9-MQ1+ZF3-KRAB или бицистронной ZF9-MQ1_ZF3-KRAB, демонстрировали снижение экспрессии mRNA MYC по сравнению с GFP, ZF-NE или ZF3-KRAB (фиг. 30A). В целом, при обработке наблюдали минимальный эффект в отношении жизнеспособности, что демонстрирует, что снижение экспрессии MYC менее значимо для нормальных клеток по сравнению с линиями клеток HCC (фиг. 30B).

В другом эксперименте обеспечивали размораживание криоконсервированных РНН в предварительно нагретой среде для размораживания гепатоцитов и

центрифугировали в течение 8 минут при 100 g при комнатной температуре. Осадок клеток ресуспендировали в среде для посева гепатоцитов. Затем подсчитывали клетки и измеряли их жизнеспособность на исходном уровне. Получали разведение клеток и 50000 клеток высевали в двух повторностях в 96-луночные планшеты. Клетки инкубировали в течение ночи. На следующий день полностью удаляли среду для посева и вносили предварительно нагретую среду для культивирования гепатоцитов. Клетки обрабатывали бицистронной ZF9-MQ1_ZF3-KRAB, ZF9-MQ1, ZF3-KRAB, ZF9-NE или контрольной mRNAGFP в количестве 2,0, 1,0 или 0,5 мкг/мл в трех повторностях и инкубировали в течение 6 часов. Затем удаляли среду для обработки и заменяли на 200 мкл свежей среды для культивирования гепатоцитов. После трансфекции клетки инкубировали еще 66 часов (всего 72 часа). После обработки содержимое одного планшета подвергали лизису реагентом CellTiter-GLO® с количественной оценкой люминесценции с помощью планшет-ридера Glo Max Discovery Plate Reader. Среду из второго планшета с клетками удаляли путем аспирации и клетки подвергали лизису с помощью буфера RLT Plus Lysis. Экстракцию mRNA проводили с применением набора Rneasy® Plus 96 Kit в соответствии с инструкциями производителя. После выделения mRNA преобразовывали в cDNA с применением набора LunaScript® RT SuperMix Kit (NEB). cDNA анализировали с помощью qPCR ΔΔCT с зондом для MYC (мишень) и GAPDH (эталон).

PHH, обработанные бицистронной ZF9-MQ1_ZF3-KRAB, демонстрировали снижение уровня mRNA MYC по сравнению с контролями (фиг. 30C). ZF9-MQ1 (все дозы) и ZF3-KRAB (2 мкг/мл) снижали уровень mRNA MYC также с минимальным эффектом в отношении жизнеспособности клеток (фиг. 30D). ZF9-NE не оказывал влияния на уровень mRNA MYC или жизнеспособность (фиг. 30C-D). В целом, при обработке бицистронной ZF9-MQ1_ZF3-KRAB наблюдали минимальный эффект в отношении жизнеспособности, что демонстрирует, что снижение экспрессии MYC в нормальных клетках не влияет на жизнеспособность клеток (фиг. 30A-D).

**Пример 30. Эффективность ZF9-MQ1+ZF3-KRAB in vivo в модели NCI-H2009, выращенной подкожно у бестимусных мышей**

В данном примере продемонстрировано, что ZF9-MQ1+ZF3-KRAB подавляет рост опухолей NCI-H2009, развившихся у самок бестимусных мышей.

Развитие заболевания вызывали у самок бестимусных мышей путем имплантации в левый бок опухолевых клеток NCI-H2009. Обработку начинали при достижении среднего объема опухоли примерно 100-150 мм$^3$. Мышей разделяли на группы обработки таким образом, чтобы значения среднего объема опухоли в каждой группе были примерно равными. mRNA доставляли в LNP с MC3. Мышам внутривенно вводили путем инъекции ZF9-MQ1+ZF3-KRAB в количестве 3 мг/кг раз в 5 дней, или любую одну или некодирующую mRNA в LNP MC3 в количестве 3 мг/кг раз в 5 дней, или цисплатин в количестве 1 мг/кг IP раз в 15 дней, или раз в 5 дней вводили PBS.

Из результатов видно, что обработка посредством ZF9-MQ1+ZF3-KRAB демонстрировала статистически значимое уменьшение размера опухоли после трех

введений, что приводило к уменьшению объема опухоли на 63% в день 25 по сравнению с контролем (фиг. 31A) без значимого эффекта на вес тела обработанных мышей (фиг. 31B). В данном исследовании обработка посредством ZF9-MQ1+ZF3-KRAB была ассоциирована с эффектом в отношении объема опухоли, эквивалентным таковому при обработке цисплатином (фиг. 31A).

**Пример 31. Эффективность совместного состава ZF9-MQ1+ZF3-KRAB in vivo в модели Hep 3B, выращенной ортотопически у мышей Fox Chase CB17 SCID**

В данном примере продемонстрировано, что долгосрочная противоопухолевая эффективность и устойчивость совместного состава ZF9-MQ1+ZF3-KRAB после введения дозы в ортотопической модели Hep3B-luc у самок мышей Fox Chase CB17 SCID.

Клетки Hep-3B-luc вводили путем инъекции мышам SCID в верхнюю левую долю печени. Среднее значение ассоциированной с опухолью биолюминесценции всего тела (TABL) в проекции снизу для каждой группы на этапе рандомизации составляло ~ $2{,}8\times10^9$ фотонов в секунду. Мышей рандомно распределяли в четыре группы по 12 мышей в каждой для обработки посредством PBS, ZF9-MQ1+ZF3-KRAB (более высокая доза, т. е. 6 мг/кг), ZF9-MQ1+ZF3-KRAB (средняя доза, т. е. 3 мг/кг), ZF9-MQ1+ZF3-KRAB (низкая доза, т. е. 3 мг/кг) и одну группу из 6 мышей для обработки сорафенибом в день 7 после имплантации клеток. Обработку начинали в день 8 после имплантации опухолевых клеток (обозначен как день 1 введения дозы на графике). Мышей обрабатывали посредством внутривенного введения PBS (раз в 5 дней для 4 доз, затем раз в 3 дня для 2 доз), LNP (MC3) с ZF9-MQ1+ZF3-KRAB (1,5 мг/кг раз в 5 дней), внутривенного введения LNP (MC3) с ZF9-MQ1+ZF3-KRAB (3 мг/кг раз в 5 дней), внутривенного введения LNP (MC3) с ZF9-MQ1+ZF3-KRAB (6 мг/кг раз в 5 дней) и перорального введения сорафениба (50 мг/кг ежедневно). Всех животных ежедневно взвешивали и визуально оценивали. Размер опухоли измеряли с помощью биолюминесценции 2 раза в неделю.

Из результатов видно, что обработка посредством ZF9-MQ1+ZF3-KRAB была ассоциирована со значимым подавлением размера опухоли после двух введений. Обработка дозой 1,5 мг/кг приводила к подавлению роста опухоли приблизительно на 63% ко дню 23 по сравнению с отрицательным контролем, обработка дозой 3 мг/кг приводила к подавлению роста опухоли приблизительно на 54% ко дню 23 по сравнению с отрицательным контролем (фиг. 32A). Аналогично, обработка дозой 6 мг/кг ZF9-MQ1+ZF3-KRAB была ассоциирована со статистически значимым уменьшением размера опухоли после двух введений, что приводило к снижению объема опухоли на 63% в день 23 по сравнению с отрицательным контролем (фиг. 32A). Обработка посредством ZF9-MQ1+ZF3-KRAB в количестве 3 мг/кг была эквивалентной обработке сорафенибом (фиг. 32A). У мышей, которых обрабатывали посредством ZF9-MQ1+ZF3-KRAB, не наблюдали значительного снижения веса тела (фиг. 32B). У мышей, которых обрабатывали сорафенибом, наблюдали первоначальное снижение веса тела с последующим увеличением общего веса тела, возможно, по причине увеличения массы опухоли (фиг. 32B). Эти данные свидетельствовали о том, что в данном исследовании обработка

посредством ZF9-MQ1+ZF3-KRAB хорошо переносилась.

**Пример 32. Бицистронная mRNA, кодирующая ZF9-MQ1 и ZF3-KRAB, снижает экспрессию MYC и жизнеспособность клеток**

В данном примере сравнивают эффективность бицистронной конструкции ZF9-MQ1_ZF3-KRAB с одиночными конструкциями ZF3-KRAB и ZF9-MQ1 и совместным составом на основе ZF3-KRAB и ZF9-MQ1. Данные конструкции доставляют в клетки гепатоклеточной карциномы посредством mRNA, инкапсулированной в липидные наночастицы (LNP).

ZF9-MQ1, ZF3-KRAB, бицистронные конструкции ZF9-MQ1_ZF3-KRAB и составленные вместе конструкции ZF9-MQ1 и ZF3-KRAB получали путем инкапсулирования соответствующих mRNA в LNP. Клетки Hep 3B трансфицировали путем посева 10000 клеток на лунку в 96-луночном планшете и дополнительно обрабатывали посредством 0,6 мкг/мл и 2 мкг/мл mRNA/LNP.

Уровень mRNA MYC и жизнеспособность клеток анализировали через 48 часов после трансфекции. Жизнеспособность измеряли с применением набора для анализа CellTiter-GLO® от Promega в соответствии с протоколом производителя. РНК выделяли из трех биологических повторностей с применением набора для 96-луночного планшета Rneasy® Plus (Qiagen) в соответствии с протоколом производителя. Образцы РНК подвергали обратной транскрипции в cDNA с помощью набора LunaScript ® RT SuperMix Kit (NEB) и анализировали с помощью количественной ПЦР (qPCR) (в трех технических повторностях) с применением набора праймеров/зондов TaqMan™, специфичных к MYC, со смесью TaqMan™ Fast Advanced Master Mix (Thermo Scientific). Экспрессию MYC количественно оценивали относительно экспрессии генов GAPDH (с применением праймера/зондов TaqMan™) с помощью способа ΔΔCt. Для нормализации экспрессии MYC использовали необработанные клетки.

Из этих данных видно, что бицистронная конструкция ZF9-MQ1_ZF3-KRAB снижала уровень mRNA MYC и жизнеспособность клеток в клетках Hep 3B в большей степени, чем одиночные конструкции (ZF3-KRAB или ZF9-MQ1) по отдельности (фиг. 33A-33B). Бицистронная ZF9-MQ1_ ZF3-KRAB в концентрациях 0,6 мкг/мл и 2 мкг/мл снижала общий уровень mRNA MYC на 99% через 48 часов (фиг. 33A). Бицистронная ZF9-MQ1_ ZF3-KRAB в концентрациях 2 мкг/мл и 0,6 мкг/мл снижала жизнеспособность клеток Hep3B на приблизительно 80% и 27%, соответственно (фиг 33B). Более того, обработка бицистронной конструкцией была равноэффективна составленным вместе конструкциям ZF3-KRAB и ZF9-MQ1.

**Пример 33. Бицистронная ZF9-MQ1_ZF3-KRAB снижает уровень mRNA MYC и жизнеспособность клеток HCC дозозависимым образом среди подтипов HCC**

В данном примере оценивают эффективность бицистронной ZF9-MQ1_ZF3-KRAB среди подтипов S1 и S2 HCC. Линии клеток HCC подтипа S1, SKHEP-1, SNU-449 и SNU-182, а также линии клеток Hep 3B и Hep G2 подтипа S2 обрабатывали бицистронной ZF9-MQ1_ZF3-KRAB. Спустя 72 часа обработки бицистронной конструкцией ZF9-MQ1_ZF3-

KRAB в последовательно разведенных концентрациях оценивали уровень mRNA MYC и жизнеспособность клеток.

Клетки HCC высевали в 96-луночные планшеты в ростовой среде (~10000 клеток/лунку). Составы с LNP (начиная с 2,5 мкг/мл) затем вносили в каждую из 3 лунок, затем разводили ~1:2 в последующих лунках 10 точек доз для трансфекции mRNA, затем инкубировали в течение 72 часов. Для оценки жизнеспособности и уровня РНК собирали планшеты с разными повторностями. Жизнеспособность измеряли с применением набора для анализа CellTiter-GLO® от Promega в соответствии с протоколом производителя. РНК выделяли из трех биологических повторностей с применением набора для 96-луночного планшета Rneasy® Plus (Qiagen) в соответствии с протоколом производителя. Образцы РНК подвергали обратной транскрипции в cDNA с помощью набора LunaScript ®SuperMix Kit (NEB) и анализировали с помощью количественной ПЦР (qPCR) (в трех технических повторностях) с применением набора праймеров/зондов TaqMan™, специфичных к MYC, со смесью TaqMan™ Fast Advanced Master Mix (Thermo Scientific). Экспрессию MYC количественно оценивали относительно экспрессии генов GAPDH (с применением праймера/зондов TaqMan™) с помощью способа ΔΔCt. Для нормализации экспрессии MYC использовали необработанные клетки.

Результаты свидетельствуют, что обработка бицистронной ZF9-MQ1_ZF3-KRAB продемонстрировала наличие эффектов, оказываемых на жизнеспособность клеток, среди всех подтипов HCC (фиг. 34A-C). Значения EC50 для подавления уровня mRNA MYC находятся в диапазоне <1-20 нг/мл без тенденции между подтипами S1 и S2 (фиг. 34D). Аналогично, потеря 50% жизнеспособности клеток приводила к более высокому диапазону значений (120-200 нг/мл) по сравнению с EC50 mRNA MYC. Ни в отношении экспрессии mRNA MYC, ни в отношении жизнеспособности клеток между подтипами S1 и S2 значимой разницы не было. Значение EC50 для трех линий подтипа S1 и двух линий подтипа S2 опухолевых клеток HCC продемонстрировало, что бицистронная ZF9-MQ1_ZF3-KRAB была эффективной против обоих подтипов HCC (фиг. 34D).

**Пример 34. Индукция апоптоза клеток HCC бицистронной ZF9-MQ1_ZF3-KRAB**

В данном примере описан эффект, оказываемый бицистронной ZF9-MQ1_ZF3-KRAB в отношении клеточного апоптоза клеток HCC. Анализы жизнеспособности, такие как CellTiter-GLO®, позволяют лишь оценить относительное количество клеток, оставшихся в лунке, исходя из уровней АТФ, и не позволяют различить потерю клеточной пролиферации и гибель клеток.

В данном примере были использованы антитела с флуоресцентной меткой к белку, представляющему собой аннексин V (аннексин V FITC), и йодид пропидия (PI) для количественной оценки апоптозных клеток в трех линиях клеток HCC: Hep 3B, Hep G2 и SK-HEP-1 после трансфекции бицистронной ZF9-MQ1_ZF3-KRAB. В качестве отрицательного контроля в дополнение к необработанным клеткам использовали некодирующую mRNA. Клетки HCC высевали в 12-луночные планшеты в ростовой среде

(50000 клеток на лунку). Затем к клеткам добавляли составы с LNP (1 мкг/мл) для введения посредством трансфекции mRNA и инкубировали в течение 48 часов. Клетки собирали и окрашивали с помощью набора для обнаружения апоптоза с помощью аннексина V и FITC от BD (BDB556570) и анализировали методом проточной цитометрии. Клетки, положительные по аннексину V-FITC и PI, классифицировали как апоптозные.

Из этих данных видно, что через 48 часов после обработки бицистронной ZF9-MQ1_ZF3-KRAB >75% апоптозных клеток было обнаружено в линиях клеток Hep 3B и Hep G2 и 15% апоптозных клеток было обнаружено в линии клеток SK-HEP-1 (фиг. 35). На клетки не влияла контрольная некодирующая mRNA по сравнению с необработанными клетками (5-20% фоновый апоптоз) (фиг. 35), что свидетельствует о том, что

бицистронная ZF9-MQ1_ZF3-KRAB была способна индуцировать клеточный апоптоз линий клеток HCC в культуре.

**Пример 35. Бицистронная ZF9-MQ1_ZF3-KRAB устойчивым образом снижает уровень mRNA MYC**

В данном примере устойчивость бицистронной ZF9-MQ1_ZF3-KRAB в отношении снижения уровня mRNA MYC оценивали после одной обработки LNP с SSOP и бицистронной ZF9-MQ1_ZF3-KRAB. Бицистронная ZF9-MQ1_ZF3-KRAB репрессирует активность MYC, направляя метилирование и репрессивные гистоновые метки к IGD MYC. Для определения продолжительности, в течение которой данные модификации могут быть эффективными, использовали клетки SK-HEP-1, поскольку они характеризовались минимальными эффектами в отношении жизнеспособности клеток после обработки бицистронной ZF9-MQ1_ZF3-KRAB. Целью данного исследования было определить, может ли одна обработка бицистронной ZF9-MQ1_ZF3-KRAB поддерживать репрессию mRNA MYC в течение ~2 недель.

Клетки SK-HEP-1 высевали в 6-луночный планшет в количестве 200000 клеток на лунку в 2 мл ростовой среды. Затем клетки обрабатывали посредством 0,6 мкг/мл бицистронной ZF9-MQ1_ZF3-KRAB или LNP с контрольной некодирующей mRNA. В день 1 после обработки бицистронной ZF9-MQ1_ZF3-KRAB клетки трипсинизировали и разделяли на три образца; 1 образец для экстракции РНК, 1 образец для экстракции геномной ДНК (gDNA), 1 образец сохраняли для будущих моментов времени. Данный процесс повторяли в дни 3, 6, 9 и 12 после обработки. В день 15 оставшиеся клетки разделяли поровну для экстракции РНК и gDNA. РНК выделяли из трех биологических повторностей с применением набора для 96-луночного планшета Rneasy® Plus (Qiagen) в соответствии с протоколом производителя. Образцы РНК подвергали обратной транскрипции в cDNA с помощью набора LunaScript ® RT SuperMix Kit (NEB) и анализировали с помощью количественной ПЦР (qPCR) (в трех технических повторностях) с применением набора праймеров/зондов TaqMan™, специфичных к MYC, со смесью TaqMan™ Fast Advanced Master Mix (Thermo Scientific). Экспрессию MYC количественно оценивали относительно экспрессии генов GAPDH (с применением

праймера/зондов TaqMan™) с помощью способа ΔΔCt. Для нормализации экспрессии MYC использовали необработанные клетки.

Из этих данных видна устойчивость модуляции экспрессии гена MYC, опосредованной бицистронной ZF9-MQ1_ZF3-KRAB. После одной обработки бицистронной ZF9-MQ1_ZF3-KRAB в клетках SKHEP1 уровни mRNA MYC снижались в день 1 и оставались репрессированными вплоть до 15 дней после обработки (фиг. 36).

**Пример 36. Бицистронная ZF9-MQ1_ZF3-KRAB снижает экспрессию mRNA и белка MYC, а также жизнеспособность клеток в линиях клеток HCC**

Экспрессию mRNA MYC и уровни белка в клетках HCC, жизнеспособность клеток и экспрессию бицистронной ZF9-MQ1_ZF3-KRAB оценивали через 6-96 часов после обработки бицистронной ZF9-MQ1_ZF3-KRAB с целью изучения фармакодинамики бицистронной ZF9-MQ1_ZF3-KRAB во множестве клеток HCC.

Клетки Hep 3B или SK-HEP-1 высевали в наборы из двух 96-луночных планшетов в количестве 10000 клеток на лунку и одного 6-луночного планшета в количестве 400000 клеток на лунку в культуральную среду для каждого момента времени. Содержимое 96-луночных планшетов обрабатывали в трех повторностях либо бицистронной ZF9-MQ1_ZF3-KRAB, либо некодирующей mRNA в количестве 1 мкг/мл для анализа жизнеспособности клеток и уровня mRNA. Содержимое 6-луночного планшета обрабатывали в двух повторностях либо бицистронной ZF9-MQ1_ZF3-KRAB, либо некодирующей mRNA в количестве 1 мкг/мл для анализа уровня белка. Клетки инкубировали в течение 6, 24, 48, 72 или 96 часов после обработки, при этом в качестве необработанных отрицательных контролей в каждый момент времени оставляли субпопуляции клеток. В каждый момент времени содержимое одного 96-луночного планшета подвергали лизису с помощью CellTiter-GLO® и количественно оценивали люминесценцию с применением GLOMAX®. Содержимое второго 96-луночного планшета подвергали лизису с помощью буфера для лизиса RLT Plus для экстракции mRNA с применением набора Rneasy® Plus 96 Kit. Лизированный образец связывали с колонкой для РНК, промывали буферами и элюировали. Затем mRNA преобразовывали в cDNA с помощью RT LunaScript®. Затем cDNA анализировали методом qPCR ΔΔCT с зондом для MYC (мишень) и GAPDH (эталон). Для выделения белка в каждый момент времени клетки из 6-луночного планшета подвергали лизису с помощью RIPA-буфера. Общий белок количественно оценивали с помощью анализа уровня белка Pierce BCA (23225). Для каждого образца загружали равные количества белка и разделяли по размеру с помощью системы для минигелей NuPAGE™ (Thermo Fisher). Затем белок переносили на мембрану из PVDF с помощью устройства для переноса геля iBlot™ 2 (Thermo Fisher). Мембраны обрабатывали в течение ночи антителом к MYC (Abcam, ab32072). В качестве контроля загрузки использовали антитело к β-актину (Cell Signaling, 8H10D10). Затем сигнал визуализировали и количественно оценивали с помощью системы для визуализации LI-COR с применением флуоресцентных вторичных антител к первичным антителам к MYC и β-актину.

В обеих линиях клеток обработка бицистронной ZF9-MQ1_ZF3-KRAB снижала экспрессию mRNA и белка MYC через 6 часов, которая оставалась сниженной спустя 96 часов по сравнению с короткой некодирующей mRNA или необработанными клетками (фиг. 37). В обеих линиях клеток снижение жизнеспособности клеток наблюдали через 48 часов после обработки бицистронной ZF9-MQ1_ZF3-KRAB (фиг. 37). Короткий некодирующий отрицательный контроль не оказывал никакого эффекта на жизнеспособность клеток.

**Пример 37. Бицистронная mRNA ZF9-MQ1_ZF3-KRAB экспрессирует как ZF9-MQ1, так и ZF3-KRAB, что визуализировано посредством HA-меченных белков**

В данном примере экспрессию белков, кодируемых бицистронной mRNA ZF9-MQ1_ZF3-KRAB/LNP, подтверждали с помощью вестерн-блоттинга. Внутри клетки бицистронная ZF9-MQ1_ZF3-KRAB продуцирует два белка с ZF (ZF3-KRAB и ZF9-MQ1), которые в данном эксперименте помечены HA, что позволяет количественно оценивать экспрессию белка после трансфекции клеток HCC.

Клетки Hep 3B или SK-HEP-1 высевали в один 6-луночный планшет в количестве 400000 клеток на лунку в культуральную среду для каждого момента времени. Содержимое 6-луночного планшета обрабатывали в двух повторностях бицистронной ZF9-MQ1_ZF3-KRAB в количестве 1 мкг/мл для анализа уровня белка. Клетки инкубировали в течение либо 6, либо 24 часов. Затем клетки лизировали в RIPA-буфере и количественно оценивали уровни общего белка с помощью анализа белка Pierce BCA (23225). Для каждого образца загружали равные количества белка и разделяли по размеру с помощью системы для минигелей NuPAGE™ (Thermo Fisher). Затем белок переносили на мембрану из PVDF с помощью устройства для переноса геля iBlot™ 2 (Thermo Fisher). Мембраны обрабатывали в течение ночи антителом Abcam к HA. В качестве контроля загрузки использовали антитело к β-актину (Cell Signaling, 8H10D10). Сигнал визуализировали и количественно оценивали с помощью системы для визуализации LI-COR с применением флуоресцентных вторичных антител к антителам к MYC и β-актину.

Как через 6 часов, так и через 24 часа после трансфекции белки как ZF3-KRAB, так и ZF9-MQ1, кодируемые бицистронной mRNA ZF9-MQ1_ZF3-KRAB, визуализировали с помощью HA-метки на результатах вестерн-блоттинга (фиг. 38). Накопление конструкций как ZF3-KRAB, так и ZF9-MQ1 наблюдали в оба момента времени.

**Пример 38. Бицистронная ZF9-MQ1_ZF3-KRAB увеличивает ответ на сорафениб в клетках HCC**

В данном примере оценивали эффект бицистронной ZF9-MQ1_ZF3-KRAB, оказываемый в отношении эффективности низкомолекулярного сорафениба (мультикиназного ингибитора) в линиях клеток HCC. Сорафениб применяют в качестве средства стандартного лечения при HCC, а высокие уровни MYC могут позволить спрогнозировать резистентность к сорафенибу. Было высказано предположение, что бицистронная ZF9-MQ1_ZF3-KRAB может возвращать чувствительность HCC к сорафенибу за счет снижения уровня активности MYC. Для оценки того, может ли

обработка бицистронной ZF9-MQ1_ZF3-KRAB снизить $IC_{50}$ сорафениба, использовали анализы зависимости дозы от ответа.

Для оценки потенциального синергизма между бицистронной ZF9-MQ1_ZF3-KRAB и сорафенибом клетки Hep 3B или SK-HEP-1 высевали в 96-луночные планшеты в количестве 10000 клеток на лунку. Затем клетки обрабатывали сорафенибом в диапазоне доз от 0,1 до 25 мкМ с серийным разведением 1:2. Затем в подгруппу лунок вносили липидную смесь, содержащую бицистронную ZF9-MQ1_ZF3-KRAB, в дозе 0,1 или 0,6 мкг/мл. Для использования в качестве контроля популяцию клеток обрабатывали только сорафенибом. После 72-часовой обработки клетки лизировали реагентом CellTiter-GLO® и количественно оценивали люминесценцию с применением Glo Max. Относительную жизнеспособность клеток рассчитывали путем усреднения значений без обработки и деления каждого экспериментально полученного значения активности люциферазы на данное среднее значение.

Таблица 19. Эффект, оказываемый бицистронной ZF9-MQ1_ZF3-KRAB в отношении $IC_{50}$ сорафениба

| Hep3B | | SKHEP-1 | |
|---|---|---|---|
| Концентрация бицистронной ZF9-MQ1_ZF3-KRAB | $IC_{50}$ сорафениба | Концентрация бицистронной ZF9-MQ1_ZF3-KRAB | $IC_{50}$ сорафениба |
| 0 мкг/мл | 4,4 мкМ | 0 мкг/мл | 12,3 мкМ |
| 0,1 мкг/мл | 4,25 мкМ | 0,1 мкг/мл | 12,3 мкМ |
| 0,6 мкг/мл | 2,9 мкМ | 0,6 мкг/мл | 10,7 мкМ |

Из данных видно, что $IC_{50}$ сорафениба в случае SKHEP1 снижалась с 12,3 до 10,7 мкМ (фиг. 39A и таблица 19), а в случае Hep 3B снижалась с 4,4 до 2,9 мкМ (фиг. 39B и таблица 19) при введении сорафениба в комбинации с 0,6 мкг/мл бицистронной ZF9-MQ1_ZF3-KRAB. $IC_{50}$ сорафениба при введении сорафениба в комбинации с 0,1 мкг/мл бицистронной ZF9-MQ1_ZF3-KRAB значимо не менялась в клетках Hep 3B или SK-HEP-1 (фиг. 39A-39B). Комбинация сорафениба и бицистронной ZF9-MQ1_ZF3-KRAB была более эффективной, чем отдельно сорафениба (фиг. 39A-39B). Эти данные свидетельствовали о синергетической активности между бицистронной ZF9-MQ1_ZF3-KRAB и сорафенибом.

**Пример 39. Бицистронная ZF9-MQ1_ZF3-KRAB увеличивает ответ на JQ1 в клетках HCC**

В данном примере оценивают эффективность бицистронной ZF9-MQ1_ZF3-KRAB в комбинации с JQ1 (ингибитором BET) на нескольких линиях клеток HCC. Было продемонстрировано, что белки BET важны для транскрипции MYC. Ингибиторы BET более позднего поколения в настоящее время проходят оценку в клинике по гематологическим показаниям; однако их профиль токсичности ограничивает их применение. Переносимость ингибиторов BET могут улучшить комбинированные

средства лечения, которые могут повысить эффективность ингибиторов BET при сниженной дозе.

Для оценки потенциального синергизма между бицистронной ZF9-MQ1_ZF3-KRAB и JQ1 клетки Hep 3B или SK-HEP-1 высевали в 96-луночные планшеты в количестве 10000 клеток на лунку. Затем клетки обрабатывали посредством JQ1 с диапазоном доз от 0,1 до 25 мкМ с серийным разведением 1:2. Затем в группу лунок вносили липидную смесь, содержащую бицистронную ZF9-MQ1_ZF3-KRAB, в дозе 0,1 или 0,6 мкг/мл. Для использования в качестве контроля популяцию клеток обрабатывали только JQ1. После 72-часовой обработки клетки лизировали реагентом CellTiter-GLO® и количественно оценивали люминесценцию с применением Glo Max. Относительную жизнеспособность клеток рассчитывали путем усреднения значений без обработки и деления каждого экспериментально полученного значения активности люциферазы на данное среднее значение.

Таблица 20. Эффект, оказываемый бицистронной ZF9-MQ1_ZF3-KRAB в отношении IC50 JQ1

| Hep3B | | SKHEP-1 | |
|---|---|---|---|
| Концентрация бицистронной ZF9-MQ1_ZF3-KRAB | $IC_{50}$ JQ1 | Концентрация бицистронной ZF9-MQ1_ZF3-KRAB | $IC_{50}$ JQ1 |
| 0 мкг/мл | 6,6 мкМ | 0 мкг/мл | >25 мкМ |
| 0,1 мкг/мл | 0,6 мкМ | 0,1 мкг/мл | 1,9 мкМ |
| 0,6 мкг/мл | 0,2 мкМ | 0,6 мкг/мл | 1,1 мкМ |

Комбинация 0,6 мкг/мл бицистронной ZF9-MQ1_ZF3-KRAB плюс JQ1 снижала $IC_{50}$ JQ1 в случае SK-HEP1 с >25 до 1,1 мкМ (фиг. 40A и таблица 20), а в случае Hep 3B с 6,6 до 0,2 мкМ (фиг. 40B и таблица 20). Комбинация 0,1 мкг/мл бицистронной ZF9-MQ1_ZF3-KRAB плюс JQ1 снижала $IC_{50}$ JQ1 в случае SK-HEP1 с >25 до 1,9 мкМ (фиг. 40A и таблица 20), а в случае Hep 3B с 6,6 до 0,6 мкМ (фиг. 40B и таблица 20). Эти данные свидетельствовали о синергетической активности между бицистронной конструкцией ZF9-MQ1_ ZF3-KRAB и JQ1.

**Пример 40. Скрининг мышиных суррогатных конструкций, предназначенных для нацеливания на геномный локус MYC**

В данном примере мышиную модель гепатоклеточной карциномы Hepa1-6 использовали для оценки конструкций, которые нацеливаются на IGD MYC у мышей. Данные конструкции (ZF15-MQ1, ZF16-MQ1 и ZF17-MQ1) были разработаны в качестве суррогатов для бицистронной ZF9-MQ1_ZF3-KRAB, которые нацеливаются на геном мыши. Оценивали способность данных конструкций снижать уровень экспрессии mRNA MYC и снижать жизнеспособность клеток HCC мыши.

Создавали панель мышиных суррогатных конструкций (ZF15-MQ1, ZF16-MQ1 и ZF17-MQ1) и ее подвергали скринингу в клетках Hepa1-6 путем высева 10000 клеток на

лунку в двух планшетах для экстракции mRNA или анализа жизнеспособности клеток. 96-луночные планшеты обрабатывали в трех повторностях кандидатными ZF в количестве 0,6 или 1,2 мкг/мл. Клетки инкубировали в течение 72 часов. После периода инкубации содержимое одного 96-луночного планшета подвергали лизису с помощью CellTiter-GLO® и количественно оценивали люминесценцию с применением планшет-ридера GloMax® Discovery. Содержимое второго 96-луночного планшета подвергали лизису с помощью буфера для лизиса RLT Plus для экстракции mRNA с применением набора Rneasy® Plus 96 Kit. Лизированный образец связывали с колонкой для РНК, промывали буферами и элюировали. Затем mRNA преобразовывали в cDNA с помощью RT LunaScript®. Затем cDNA анализировали методом qPCR ΔΔCT с зондом для MYC (мишень) и GAPDH (эталон).

По результатам данного скрининга было видно, что ZF17-MQ1 демонстрировал снижение уровня mRNA MYC мыши (фиг. 41A), что соответствует снижению жизнеспособности (фиг. 41B).

**Пример 41. Эффект мышиной суррогатной конструкции ZF17-MQ1 на жизнеспособность клеток HCC и экспрессию mRNA и белка MYC**

В данном примере мышиную модель гепатоклеточной карциномы Hepa1-6 использовали для оценки эффекта конструкции ZF17-MQ1, снижающей уровень экспрессии mRNA и белка MYC, а также жизнеспособность клеток HCC мыши.

Уровень mRNA MYC и жизнеспособность клеток анализировали спустя 96 часов после обработки посредством mRNA ZF17-MQ1 или GFP. Клетки Hepa1-6 высевали в количестве 10000 клеток на лунку в планшеты в двух повторностях для экстракции mRNA или анализа жизнеспособности клеток. 96-луночные планшеты обрабатывали в трех повторностях посредством

ZF17-MQ1 в количестве 0,6 или 1,2 мкг/мл. После инкубации содержимое одного 96-луночного планшета подвергали лизису с помощью CellTiter-GLO® и количественно оценивали люминесценцию с применением планшет-ридера GloMax® Discovery. Содержимое второго 96-луночного планшета подвергали лизису с помощью буфера для лизиса RLT Plus для экстракции mRNA с применением набора RNeasy® Plus 96 Kit. Лизированный образец связывали с колонкой для РНК, промывали буферами и элюировали. Затем mRNA преобразовывали в cDNA с помощью RT Lunascript. Затем cDNA анализировали методом qPCR ΔΔCT с зондом для MYC (мишень) и GAPDH (эталон).

Уровни белка MYC анализировали спустя 24 и 48 часов после обработки путем трансфекции 100000 клеток в 12-луночном планшете посредством mRNA ZF17-MQ1 или контрольной mRNA GFP. Клетки лизировали в RIPA-буфере и количественно оценивали уровни общего белка с помощью анализа белка Pierce BCA (23225). Для каждого образца загружали равные количества белка и разделяли по размеру с помощью системы для минигелей NuPAGE™ (Thermo Fisher). Затем белок переносили на мембрану из PVDF с помощью устройства для переноса геля iBlot™ (Thermo Fisher). Мембраны обрабатывали

в течение ночи антителом к MYC (Abcam, ab32072). В качестве контроля загрузки использовали антитело к β-актину (Cell Signaling, 8H10D10). Затем сигнал визуализировали и количественно оценивали с помощью системы для визуализации LI-COR с применением флуоресцентных вторичных антител к антителам к MYC и β-актину.

Из данных видно, что ZF17-MQ1 была способна функционировать как мышиный суррогат для бицистронной ZF9-MQ1_ZF3-KRAB, нацеливаясь на IGD MYC. Обработка посредством ZF17-MQ1 HCC-клеток Hepa1-6 мыши демонстрировала значительное снижение уровня белка MYC через 24 и 48 часов (фиг. 42A). Обработка посредством ZF17-MQ1 в клетках HCC мыши Hepa1-6 демонстрировала значительное снижение уровня mRNA MYC через 96 часов (фиг. 42C) и снижение жизнеспособности клеток через 96 часов (фиг. 42D).

**Пример 42. Подкожная сингенная модель Hepa1-6, демонстрирующая эффективность ZF17-MQ1**

В данном примере продемонстрирована эффективность ZF17-MQ1 у иммунокомпетентного животного. В частности, Hepa1-6 имплантируют сингенным реципиентным нормальным мышам C57BL/6.

Развитие заболевания вызывали у самок мышей C57BL/6 путем имплантации в левый бок опухолевых клеток Hepa1-6. Обработку начинали при достижении среднего объема опухоли ~150 мм$^3$. Мышей разделяли на группы обработки (по 9 мышей в каждой в случае PBS или ZF17-MQ1, 6 мышей в случае сорафениба) таким образом, чтобы средний объем опухоли в каждой группе был примерно равным. Мышам внутривенно вводили путем инъекции PBS или ZF17-MQ1 в количестве 3 мг/кг. Положительный контроль в виде лекарственного средства стандартного лечения сорафениба в количестве 50 мг/кг вводили каждый день перорально через желудочный зонд. ZF17-MQ1 вводили каждые 5 дней в течение 4 доз, затем обеспечивали 2-недельные лекарственные каникулы с повторным началом лечения в течение еще двух циклов. Всех животных ежедневно взвешивали и визуально оценивали. Размер опухоли измеряли штангенциркулем 3 раза в неделю.

Из результатов было видно, что после 4 доз ZF17-MQ1 значительно снижал опухолевую нагрузку у животных (фиг. 43). После лекарственных каникул повторное лечение мышей приводило к полному истощению опухоли по прошествии ~4 недель (фиг. 43). Из этих данных видно, что ZF17-MQ1 может эффективно снижать опухолевую нагрузку в ксенотрансплантатах HCC у иммунокомпетентных животных.

**Пример 43. Эпигенетическая модуляция онкогена MYC как потенциальная новая терапия HCC**

В данном примере описано изучение характеристик бицистронной ZF9-MQ1-ZF3-KRAB в линиях клеток HCC (Hep 3B, Hep G2, SK-HEP-1, SNU-182 и SNU-449) путем измерения уровня mRNA MYC и жизнеспособности клеток.

Изучали характеристики бицистронной конструкции ZF9-MQ1_ZF3KRAB в линиях клеток HCC (Hep 3B, Hep G2, SK-HEP-1, SNU-182 и SNU-449) путем измерения

уровня mRNA MYC и жизнеспособности клеток. Бицистронную ZF9-MQ1_ZF3KRAB тестировали на устойчивые эпигенетические (например, метилирование ДНК/хроматина) и транскриптомные (например, секвенирование РНК) изменения. Изменения уровней белка MYC и сигналов в сигнальном пути измеряли с помощью различных протеомических способов. Наконец, активность бицистронной ZF9-MQ1_ZF3KRAB анализировали in vivo в моделях подкожной (subQ) и ортотопической HCC путем оценки объема опухоли, опухолеассоциированной биолюминесценции (BLI) и иммуногистохимии (IHC).

Идентифицировали конструкции, в том числе бицистронную ZF9-MQ1_ZF3-KRAB, которые нацеливаются на несколько локусов на IGD MYC и которые были эффективны в снижении уровня mRNA MYC, белка и жизнеспособности клеток в клетках HCC, сохраняя при этом нормальные клетки. В клетках HCC медианное значение EC50 ингибирования бицистронной ZF9-MQ1_ZF3KRAB составляет <0,001 нг/мл в отношении mRNA MYC и 120 нг/мл в отношении жизнеспособности клеток. Важно отметить, что эффекты бицистронной ZF9-MQ1_ZF3KRAB сохранялись в течение более 2 недель, обеспечивая устойчивую репрессию mRNA MYC. Внутривенная доставка бицистронной ZF9-MQ1_ZF3KRAB в LNP в количестве 3 и 6 мг/кг Q5D в subQ модели Hep 3B у бестимусных "голых" мышей демонстрировала статистически значимое подавление роста опухоли (TGI) на 54% и 63% соответственно в день 23 по сравнению с отрицательным контролем. У мышей, которых обрабатывали бицистронной ZF9-MQ1_ZF3KRAB, не наблюдали значимого снижения веса тела (BW) по сравнению с мышами отрицательного контроля или мышами, которых обрабатывали сорафенибом. IHC опухолей, обработанных бицистронной ZF9-MQ1_ZF3KRAB и контролем, показала значительное снижение активности MYC и Ki67, маркера пролиферации, и повышение активности каспазы 3, маркера апоптоза. В ортотопической модели Hep 3B введение 3 мг/кг бицистронной ZF9-MQ1_ZF3KRAB Q5D демонстрировало сравнимое снижение BLI с сорафенибом в количестве 50 мг/кг QD без снижения BW.

**Пример 44. Эффект мышиных суррогатных конструкций на экспрессию MYC и жизнеспособность клеток в клетках LL2**

Пример направлен на оценку эффекта мышиных суррогатных конструкций (ZF15-MQ1, ZF16-MQ1 и ZF17-MQ1) на экспрессию MYC и жизнеспособность клеток в клетках LL2.

Клетки LL2 высевали в количестве 5000 клеток на лунку в 96-луночные планшеты в двух повторностях для экстракции mRNA или анализа жизнеспособности клеток. 96-луночные планшеты в трех повторностях обрабатывали посредством LNP, загруженных ZF15-MQ1, ZF16-MQ1 или ZF17-MQ1, в количестве 0,625 мкг/мл (для процедур считывания уровня mRNA и жизнеспособности) и в количестве 1,25 мкг/мл (процедуры считывания уровня mRNA и жизнеспособности) и инкубировали. В 6-луночные планшеты высевали по 200000 клеток на лунку и клетки трансфицировали указанными выше конструкциями в количестве 1,25 мкг/мл (для считывания методом вестерн-блоттинга). В

качестве отрицательного контроля использовали клетки, обработанные посредством GFP. После инкубации содержимое одного 96-луночного планшета подвергали лизису с помощью CellTiter-GLO® и количественно оценивали люминесценцию с применением планшет-ридера GloMax® Discovery. Содержимое второго 96-луночного планшета подвергали лизису с помощью буфера для лизиса RLT Plus для экстракции mRNA с применением набора Rneasy® Plus 96 Kit. Лизированный образец связывали с колонкой для РНК, промывали буферами и элюировали. Затем mRNA преобразовывали в cDNA с применением поли(A)-праймера с помощью RT Lunascript. Затем cDNA использовали для анализа методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (RT-PCR) с применением зондов TaqMan™ (Thermo Fisher), которые специфичны к транскриптам mRNA MYC мыши. Для нормализации по группам использовали уровни транскриптов mRNA GAPDH. Для вестерн-блоттинга антитело к β-актину окрашивали вторичным антителом, меченным флуорофором, испускающим волны при длине волны 594 нм, а антитело к MYC (Abcam) обнаруживали с помощью вторичного антитела, меченного флуорофором, испускающим волны при длине волны 488 нм. Систему для визуализации Odyssey® CLx (LI-COR), в которой используется флуоресценция в ближней инфракрасной области спектра (NIR), использовали для получения изображений белков.

Клетки, обработанные посредством ZF17-MQ1, демонстрировали сниженные уровни белка MYC в клетках LL2 по сравнению с клетками в условиях без обработки или клетками в условиях обработки посредством GFP (фиг. 44A). По сравнению с уровнями, наблюдаемыми в необработанных клетках, ZF17-MQ1 и ZF16-MQ1 в клетках LL2 снижали уровни mRNA MYC на >99,9% или 74%, соответственно (фиг. 44B). Кроме того, все три конструкции были способны снижать жизнеспособность клеток в клетках LL2 в большей степени, чем в необработанных клетках и клетках, обработанных посредством GFP (фиг. 44C). По сравнению с необработанными клетками в клетках LL2 конструкции ZF17-MQ1, ZF16-MQ1 и ZF15-MQ1 снижали жизнеспособность до 74%, 65% и 30%, соответственно.

**Пример 45. Уровень транскрипта MYC снижается в клетках LL2 и CT26, обработанных посредством ZF17-MQ1**

Данный пример направлен на оценку эффективности конструкции ZF17-MQ1 в снижении уровня экспрессии mRNA MYC и снижении жизнеспособности клеток в клетках CT26 и LL2.

Клетки CT26 и LL2 высевали в количестве 2500 клеток на лунку в планшеты в двух повторностях для экстракции mRNA или анализа жизнеспособности клеток. 96-луночные планшеты обрабатывали в трех повторностях посредством LNP, загруженных ZF17-MQ1, в количестве 1,25 мкг/мл и 2,5 мкг/мл и инкубировали. В качестве контролей использовали необработанные клетки и клетки, обработанные посредством GFP. После инкубации содержимое одного 96-луночного планшета подвергали лизису с помощью CellTiter-GLO® и количественно оценивали люминесценцию с применением планшет-ридера GloMax® Discovery. Содержимое второго 96-луночного планшета подвергали

лизису с помощью буфера для лизиса RLT Plus для экстракции mRNA с применением набора Rneasy® Plus 96 Kit. Лизированный образец связывали с колонкой для РНК, промывали буферами и элюировали. Затем mRNA преобразовывали в cDNA с применением поли(A)-праймера с помощью RT Lunascript. Затем cDNA использовали для анализа методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (RT-PCR) с применением зондов TaqMan™ (Thermo Fisher), которые специфичны к транскриптам mRNA MYC мыши. Для нормализации по группам использовали уровни транскриптов mRNA GAPDH.

Из данных видно, что ZF17-MQ1 снижал уровень mRNA MYC и снижал жизнеспособность клеток в клетках LL2 и CT26 в большей степени, чем в необработанных клетках и клетках, обработанных посредством GFP (отрицательный контроль). По сравнению с уровнями, наблюдаемыми в необработанных клетках, при 2,5 мкг/мл ZF17-MQ1 снижал уровни mRNA MYC на 93% и 85% в клетках LL2 и CT26, соответственно (фиг. 45A). Более того, по сравнению с необработанными клетками в этих условиях ZF17-MQ1 снижал жизнеспособность клеток на 87% и 93% в клетках LL2 и CT26, соответственно (фиг. 45B).

**Пример 46. Уровень транскрипта MYC снижается в клетках LL2 и CMT167, обработанных посредством ZF17-MQ1**

Данный пример направлен на оценку эффективности конструкции ZF17-MQ1 в снижении уровня экспрессии mRNA MYC и снижении жизнеспособности клеток в клетках CMT167 и LL2.

Клетки CMT167 и LL2 высевали в количестве 5000 клеток на лунку в планшеты в двух повторностях для экстракции mRNA или анализа жизнеспособности клеток. 96-луночные планшеты обрабатывали в трех повторностях посредством LNP, загруженных GFP, некодирующей РНК или ZF17-MQ1, в количестве 1,0 мкг/мл и инкубировали. В качестве контролей использовали необработанные клетки и клетки, обработанные посредством GFP. После инкубации содержимое одного 96-луночного планшета подвергали лизису с помощью CellTiter-GLO® и количественно оценивали люминесценцию с применением планшет-ридера GloMax® Discovery. Содержимое второго 96-луночного планшета подвергали лизису с помощью буфера для лизиса RLT Plus для экстракции mRNA с применением набора Rneasy® Plus 96 Kit. Лизированный образец связывали с колонкой для РНК, промывали буферами и элюировали. Затем mRNA преобразовывали в cDNA с применением поли(A)-праймера с помощью RT Lunascript. Затем cDNA использовали для анализа методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (RT-PCR) с применением зондов TaqMan™ (Thermo Fisher), которые специфичны к транскриптам mRNA MYC мыши. Для нормализации по группам использовали уровни транскриптов mRNA GAPDH.

Из данных видно, что ZF17-MQ1 снижал уровень mRNA MYC и снижает жизнеспособность клеток в клетках CMT167 и LL2 в большей степени, чем в необработанных клетках и клетках, обработанных посредством GFP (отрицательный

контроль). По сравнению с уровнями, наблюдаемыми в необработанных клетках, ZF17-MQ1 снижал уровни mRNA MYC на 62% и 73% в клетках CMT167 и LL2, соответственно (фиг. 46). Более того, по сравнению с необработанными клетками в этих условиях ZF17-MQ1 снижал жизнеспособность клеток на 54% и 57% в клетках CMT167 и LL2, соответственно (фиг. 46).

**Пример 47. ZF9-MQ1 демонстрирует слабый эффект на жизнеспособность первичных клеток**

В данном примере оценивают эффект конструкции ZF9-MQ1, оказываемый на жизнеспособность первичных клеток.

Для анализа жизнеспособности клеток первичные эпителиальные клетки мелких дыхательных путей, первичные долевые эпителиальные клетки и первичные клетки фибробластов легких высевали в количестве 7500 (первичные эпителиальные клетки мелких дыхательных путей) или 5000 (первичные долевые эпителиальные клетки и первичные фибробласты легких) клеток на лунку в планшетах в двух повторностях. 96-луночные планшеты обрабатывали в трех повторностях посредством LNP, загруженных GFP или ZF9-MQ1, в количестве 1,0 мкг/мл и инкубировали. В качестве контролей использовали необработанные клетки и клетки, обработанные посредством GFP. После инкубации содержимое одного 96-луночного планшета подвергали лизису с помощью CellTiter-GLO® и количественно оценивали люминесценцию с применением планшет-ридера GloMax® Discovery. Содержимое второго 96-луночного планшета подвергали лизису с помощью буфера для лизиса RLT Plus для экстракции mRNA с применением набора Rneasy® Plus 96 Kit. Лизированный образец связывали с колонкой для РНК, промывали буферами и элюировали. Затем mRNA преобразовывали в cDNA с применением поли(A)-праймера с помощью RT Lunascript. Затем cDNA использовали для анализа методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (RT-PCR) с применением зондов TaqMan™ (Thermo Fisher), которые специфичны к транскриптам mRNA MYC человека. Для нормализации по группам использовали уровни транскриптов mRNA GAPDH.

Из данных видно, что ZF9-MQ1 снижал уровни mRNA MYC на 94%, 96%, 96% по сравнению с необработанными клетками в первичных эпителиальных клетках малых дыхательных путей, первичных долевых эпителиальных клетках и первичных фибробластах легких соответственно (фиг. 47). Однако жизнеспособность снижалась только на 16%, 9% и 22% по сравнению с контрольными клетками, что позволяет предположить, что ZF9-MQ1 оказывал лишь незначительный эффект на жизнеспособность клеток нормального эпителия или фибробластов легких, в отличие от предыдущих результатов, полученных в случае раковых клеток H2009.

**Пример 48. Совместная обработка посредством ZF9-MQ1 с JQ1 демонстрировала более чем аддитивный эффект на жизнеспособность A549**

В данном примере оценивают эффект конструкции ZF9-MQ1, оказываемый на жизнеспособность клеток A549 при применении в комбинации с различными

концентрациями ингибитора JQ1.

Клетки A549 высевали в количестве 4000 клеток на лунку в планшеты в двух повторностях для анализа жизнеспособности клеток. 96-луночные планшеты обрабатывали в трех повторностях посредством LNP, загруженных GFP или ZF9-MQ1, в количестве 0,5 мкг/мл или 1,0 мкг/мл в комбинации с повышающимися концентрациями ингибитора BET JQ1 (концентрации до 6,25 мкМ) и инкубировали. В качестве контролей использовали необработанные клетки и клетки, обработанные посредством GFP. После 72-часовой инкубации содержимое одного 96-луночного планшета подвергали лизису с помощью CellTiter-GLO® и количественно оценивали люминесценцию с применением планшет-ридера GloMax® Discovery.

Из данных видно, что ZF9-MQ1 и JQ1, каждый по отдельности, подавляли жизнеспособность клеток A549 (фиг. 48A). В комбинации ZF9-MQ1 (0,5 или 1 мкг/мл) и JQ1 (концентрации до 6,25 мкМ) демонстрировали более чем аддитивный эффект на подавление жизнеспособности A549, чем это можно спрогнозировать по их индивидуальной активности, что позволяет предположить, что комбинация ZF9-MQ1 и JQ1 оказывала синергетическое действие на подавление жизнеспособности клеток A549 (фиг. 48B-48C).

**Пример 49. Совместная обработка посредством ZF9-MQ1 с BET762 демонстрировала более чем аддитивный эффект на жизнеспособность A549**

В данном примере оценивают эффект конструкции ZF9-MQ1, оказываемый на жизнеспособность клеток A549 при применении в комбинации с различными концентрациями ингибитора BET762.

Клетки A549 высевали в количестве 4000 клеток на лунку в планшеты в двух повторностях для анализа жизнеспособности клеток. 96-луночные планшеты обрабатывали в трех повторностях посредством LNP, загруженных GFP или ZF9-MQ1, в количестве 0,5 мкг/мл или 1,0 мкг/мл в комбинации с повышающимися концентрациями (концентрации до 1,25 мкМ) ингибитора BET BET762 и инкубировали. В качестве контролей использовали необработанные клетки и клетки, обработанные посредством GFP. После 72-часовой инкубации содержимое одного 96-луночного планшета подвергали лизису с помощью CellTiter-GLO® и количественно оценивали люминесценцию с применением планшет-ридера GloMax® Discovery.

Из данных видно, что ZF9-MQ1 и BET762, каждый по отдельности, подавляли жизнеспособность клеток A549 (фиг. 49A). В комбинации ZF9-MQ1 (0,5 мкг/мл) и BET762 (концентрации до 1,25 мкМ для клеток, обработанных посредством 0,5 мкг/мл ZF9-MQ1, и до 0,625 мкМ для клеток, обработанных посредством 1,0 мкг/мл ZF9-MQ1) демонстрировали более чем аддитивный эффект на подавление жизнеспособности A549, чем это можно спрогнозировать по их индивидуальной активности (фиг. 49B). В комбинации ZF9-MQ1 (1,0 мкг/мл) и BET762 (концентрации до 0,625 мкМ) демонстрировали более чем аддитивный эффект на подавление жизнеспособности A549 (фиг. 49C), чем это можно спрогнозировать по их индивидуальной активности. Данные

позволяют предположить о том, что комбинация ZF9-MQ1 и BET762 оказывает синергетическое действие на подавление жизнеспособности клеток A549 (фиг. 49B-C).

**Пример 50. Совместная обработка посредством ZF9-MQ1 с бирабресибом демонстрировала более чем аддитивный эффект на жизнеспособность A549**

В данном примере оценивают эффект конструкции ZF9-MQ1, оказываемый на жизнеспособность клеток A549 при применении в комбинации с различными концентрациями ингибитора BET, бирабресиба.

Клетки A549 высевали в количестве 4000 клеток на лунку в планшеты в двух повторностях для анализа жизнеспособности клеток. 96-луночные планшеты обрабатывали в трех повторностях посредством LNP, загруженных GFP или ZF9-MQ1, в количестве 0,5 мкг/мл или 1,0 мкг/мл в комбинации с повышающимися концентрациями (концентрации до 0,625 мкМ для клеток, обработанных посредством 0,5 мкг/мл ZF9-MQ1, и до 0,313 мкМ для клеток, обработанных посредством 1,0 мкг/мл ZF9-MQ1) ингибитора BET бирабресиба и инкубировали. В качестве контролей использовали необработанные клетки и клетки, обработанные посредством GFP. После 72-часовой инкубации содержимое одного 96-луночного планшета подвергали лизису с помощью CellTiter-GLO® и количественно оценивали люминесценцию с применением планшет-ридера GloMax® Discovery.

Из данных видно, что ZF9-MQ1 и бирабресиб, каждый по отдельности, подавляли жизнеспособность клеток A549 (фиг. 50A). В комбинации ZF9-MQ1 (0,5 мкг/мл) и бирабресиб (концентрации до 0,625 мкМ) демонстрировали более чем аддитивный эффект на подавление жизнеспособности A549, чем это можно спрогнозировать по их индивидуальной активности (фиг. 50B). В комбинации ZF9-MQ1 (1,0 мкг/мл) и бирабресиб (концентрации до 0,313 мкМ) демонстрировали более чем аддитивный эффект на подавление жизнеспособности A549 (фиг. 50C), чем это можно спрогнозировать по их индивидуальной активности. Данные позволяют предположить о том, что комбинация ZF9-MQ1 и бирабресиба оказывает синергетическое действие на подавление жизнеспособности клеток A549 (фиг. 50B-50C).

**Пример 51. Совместная обработка посредством ZF9-MQ1 с траметинибом демонстрировала более чем аддитивный эффект на жизнеспособность A549**

В данном примере оценивают эффект конструкции ZF9-MQ1, оказываемый на жизнеспособность клеток A549 при применении в комбинации с различными концентрациями ингибитора MEK, траметиниба.

Клетки A549 высевали в количестве 4000 клеток на лунку в планшеты в двух повторностях для анализа жизнеспособности клеток. 96-луночные планшеты обрабатывали в трех повторностях посредством LNP, загруженных GFP или ZF9-MQ1, в количестве 0,5 мкг/мл или 1,0 мкг/мл в комбинации с повышающимися концентрациями (концентрации до 0,05 мкМ) ингибитора MEK траметиниба и инкубировали. В качестве контролей использовали необработанные клетки и клетки, обработанные посредством GFP. После 72-часовой инкубации содержимое одного 96-луночного планшета подвергали

лизису с помощью CellTiter-GLO® и количественно оценивали люминесценцию с применением планшет-ридера GloMax® Discovery.

Из данных видно, что ZF9-MQ1 и траметиниб, каждый по отдельности, подавляли жизнеспособность клеток A549 (фиг. 51A). В комбинации ZF9-MQ1 (0,5 мкг/мл) и траметиниб (концентрации до 0,05 мкМ) демонстрировали более чем аддитивный эффект на подавление жизнеспособности A549, чем это можно спрогнозировать по их индивидуальной активности (фиг. 51B). В комбинации ZF9-MQ1 (1,0 мкг/мл) и траметиниб (концентрации до 0,05 мкМ) демонстрировали более чем аддитивный эффект на подавление жизнеспособности A549 (фиг. 51C), чем это можно спрогнозировать по их индивидуальной активности. Данные позволяют предположить о том, что комбинация ZF9-MQ1 и траметиниба оказывает синергетическое действие на подавление жизнеспособности клеток A549 (фиг. 51B-51C).

**Пример 52. Исследование снижения активности MYC с помощью панели конструкций ZF-KRAB, нацеливающихся на суперэнхансерные области, в нескольких линиях клеток**

В данном примере оценивают эффект ZF9-MQ1 и панели конструкций с "цинковыми пальцами" ZF9-MQ1, ZF54-KRAB, ZF61-KRAB, ZF67-KRAB и ZF68-KRAB, нацеливающихся на суперэнхансерные области, на снижение активности MYC в клетках H2009, H460 и H226.

Клетки H2009 и H226 высевали в количестве 5000 клеток на лунку в планшеты в двух повторностях для анализа mRNA. 96-луночные планшеты обрабатывали в трех повторностях посредством LNP, загруженных GFP, ZF9-MQ1, ZF54-KRAB, ZF67-KRAB или ZF68-KRAB, в количестве 1,0 мкг/мл и инкубировали. Клетки H226 также обрабатывали в трех повторностях посредством LNP, загруженных некодирующей РНК, в количестве 1,0 мкг/мл и инкубировали. Клетки H460 высевали в количестве 5000 клеток на лунку в планшеты в двух повторностях для анализа mRNA. 96-луночные планшеты обрабатывали в трех повторностях посредством LNP, загруженных GFP, ZF9-MQ1, ZF61-KRAB, ZF67-KRAB или ZF68-KRAB, в количестве 1,0 мкг/мл и инкубировали. В качестве контролей использовали необработанные клетки и клетки, обработанные посредством GFP. После инкубации в течение 72 часов клетки подвергали лизису с помощью буфера RLT Plus Lysis для экстракции mRNA с применением набора Rneasy® Plus 96 Kit. Лизированный образец связывали с колонкой для РНК, промывали буферами и элюировали. Затем mRNA преобразовывали в cDNA с применением поли(A)-праймеров с помощью RT Lunascript. Затем cDNA использовали для анализа методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (RT-PCR) с применением зондов TaqMan™ (Thermo Fisher), которые специфичны к транскриптам mRNA MYC человека. Для нормализации по группам использовали уровни транскриптов mRNA GAPDH.

Из данных видно, что ZF9-MQ1, ZF54-KRAB, ZF67-KRAB и ZF68-KRAB снижали уровни mRNA MYC в H2009 на по меньшей мере 42% (фиг. 52A) и в клетках H226 на по меньшей мере 27% по сравнению с необработанными клетками (фиг. 52B-52C). Помимо

этого, ZF9-MQ1, ZF61-KRAB, ZF67-KRAB и ZF68-KRAB снижали уровни mRNA MYC в клетках H460 на по меньшей мере 26% по сравнению с необработанными клетками (фиг. 52D).

**Пример 53. Совместная обработка посредством ZF54-KRAB и ZF9-MQ1 дополнительно снижает уровень mRNA MYC по сравнению с ZF9-MQ1 отдельно**

В данном примере оценивают эффект комбинированной обработки посредством ZF9-MQ1 и ZF54-KRAB в отношении снижения уровня активности MYC в клетках H2009.

Клетки H2009 высевали в количестве 5000 клеток на лунку в 96-луночный планшет для анализа mRNA. Стенки в планшете обрабатывали в трех повторностях посредством LNP, загруженных GFP, ZF9-MQ1, в количестве 1,0 мкг/мл или 2,0 мкг/мл в комбинации с возрастающими концентрациями LNP, загруженных ZF9-MQ1, и инкубировали в течение 72 часов. В качестве контролей использовали необработанные клетки и клетки, обработанные посредством GFP. После инкубации клетки подвергали лизису с помощью буфера RLT Plus Lysis для экстракции mRNA с применением набора Rneasy® Plus 96 Kit. Лизированный образец связывали с колонкой для РНК, промывали буферами и элюировали. Затем mRNA преобразовывали в cDNA с применением поли(A)-праймера с помощью RT Lunascript. Затем cDNA использовали для анализа методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (RT-PCR) с применением зондов TaqMan™ (Thermo Fisher), которые специфичны к транскриптам mRNA MYC человека. Для нормализации по группам использовали уровни транскриптов mRNA GAPDH.

Из данных видно, что в наиболее высокой протестированной концентрации ZF9-MQ1 и ZF54-KRAB, каждый по отдельности, снижали уровень mRNA MYC в клетках H2009 на 99% или 62%, соответственно, по сравнению с необработанными контрольными клетками. При использовании менее 0,313 мкг/мл ZF9-MQ1 в комбинации с 1 или 2 мкг/мл ZF54-KRAB уровень mRNA MYC снижается в большей степени, чем наблюдали при любой обработке по отдельности, что указывает на то, что каждый ZF9-MQ1 и ZF54-KRAB способствовал снижению уровней mRNA MYC в клетках линии H2009 в условиях in vitro (фиг. 53).

**Пример 54. Комбинация 1:1 ZF9-MQ1 и ZF54-KRAB супрессировала экспрессию MYC во все моменты времени в течение периода, составлявшего до по меньшей мере 6 дней**

В данном примере оценивают устойчивость комбинированной обработки посредством ZF9-MQ1 и ZF54-KRAB в отношении снижения уровня активности MYC в клетках H1299.

Клетки H1299 высевали в количестве 10000 клеток на лунку в 96-луночные планшеты для анализа mRNA. Стенки в 96-луночном планшете обрабатывали в трех повторностях посредством LNP, загруженных GFP, ZF54-KRAB или ZF9-MQ1+ZF54-KRAB, в количестве 1,0 мкг/мл и инкубировали. В качестве контролей использовали необработанные клетки и клетки, обработанные посредством GFP. Измерения проводили через 6 часов, 1 день, 2 дня, 3 дня или 6 дней после трансфекции. После инкубации

содержимое одного 96-луночного планшета подвергали лизису с помощью буфера для лизиса RLT Plus для экстракции mRNA с применением набора Rneasy® Plus 96 Kit. Лизированный образец связывали с колонкой для РНК, промывали буферами и элюировали. Затем mRNA преобразовывали в cDNA с применением поли(A)-праймера с помощью RT Lunascript. Затем cDNA использовали для анализа методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (RT-PCR) с применением зондов TaqMan™ (Thermo Fisher), которые специфичны к транскриптам mRNA MYC человека. Для нормализации по группам использовали уровни транскриптов mRNA GAPDH.

Из данных видно, что ZF9-MQ1 снижала уровень mRNA MYC в клетках H1299 на 95% по сравнению с необработанными контрольными клетками через 48 часов и сохраняла снижение уровня на 90% от контрольных уровней через 144 часа. Комбинация ZF9-MQ1 плюс ZF54-KRAB снижала уровни mRNA MYC до величины 98% через 48 часов и сохраняла снижение уровня до величины 93% относительно контрольных уровней через 144 часа (фиг. 54). Более того, из данных видно, что ZF9-MQ1 и ZF9-MQ1 в комбинации с ZF54-KRAB снижали уровни mRNA MYC в клетках H1299 на по меньшей мере 6 дней (фиг. 54).

**Пример 55. Бицистронная ZF9-MQ1_ ZF54-KRAB подавляет уровни MYC раньше, чем ZF9-MQ1**

В данном примере оценивают эффективность бицистронных конструкций ZF9-MQ1_ZF54-KRAB и ZF54-KRAB_ZF9-MQ1 по сравнению с отдельно конструкциями ZF9-MQ1 и ZF54-KRAB.

Клетки H2009 высевали в количестве 5000 клеток на лунку в 96-луночный планшет для анализа mRNA. Стенки 96-луночного планшета обрабатывали в трех повторностях посредством LNP, загруженных GFP, ZF9-MQ1, ZF54-KRAB, ZF9-MQ1_ZF54-KRAB или ZF54-KRAB_ZF9-MQ1, в количестве 0,5 мкг/мл или 1,0 мкг/мл и инкубировали. В качестве контролей использовали необработанные клетки и клетки, обработанные посредством GFP. Измерения проводили через 24 часа и 48 часов после трансфекции. После инкубации содержимое одного 96-луночного планшета подвергали лизису с помощью буфера для лизиса RLT Plus для экстракции mRNA с применением набора Rneasy® Plus 96 Kit. Лизированный образец связывали с колонкой для РНК, промывали буферами и элюировали. Затем mRNA преобразовывали в cDNA с применением поли(A)-праймера с помощью RT Lunascript. Затем cDNA использовали для анализа методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (RT-PCR) с применением зондов TaqMan™ (Thermo Fisher), которые специфичны к транскриптам mRNA MYC человека. Для нормализации по группам использовали уровни транскриптов mRNA GAPDH.

Из данных видно, что через 24 часа после введения в клетки H2009 ZF9-MQ1 и ZF54-KRAB снижали уровни mRNA MYC на величину до 83% и 55%, соответственно, по сравнению с необработанными клетками. Уровни mRNA MYC дополнительно снижались еще на 13% в клетках, обработанных посредством ZF9-MQ1, до величины 96%

относительно необработанных контролей через 48 часов после обработки, тогда как ZF54-KRAB дополнительно не снижал уровни MYC. Уровни mRNA MYC в клетках, обработанных посредством ZF9-MQ1_ZF54-KRAB и ZF54-KRAB_ZF9-MQ1, снижались до величины 95% и 96% относительно контрольных клеток, соответственно, через 24 часа после обработки. Данные свидетельствовали, что данные регуляторы были способны снижать уровни mRNA MYC раньше, чем ZF9-MQ1, что приводило к более высокой степени снижения уровня активности MYC в обработанных клетках по сравнению с обработанными посредством ZF9-MQ1 клетками через 24 часа в клетках H2009. (Фиг. 55).

**Пример 56. Эффект обработки посредством ZF9-MQ1 на подавление роста опухоли у мышей с SQ опухолью H460**

В данном примере продемонстрировано, что ZF9-MQ1 подавляет рост подкожных опухолей H460, развившихся у бестимусных мышей.

Развитие заболевания вызывали у бестимусных мышей путем имплантации в левый бок подкожных опухолевых клеток H460. Обработку начинали при достижении среднего объема опухоли примерно 100-150 мм$^3$. Мышей разделяли на группы обработки таким образом, чтобы средний объем опухоли в каждой группе был примерно равным. Опухоли обрабатывали посредством PBS (среды-носителя), сорафенибом (средство стандартного лечения), некодирующей РНК в составе LNP с MC3 или mRNA ZF9-MQ1 в составе LNP с MC3. PBS, LNP с некодирующей РНК (SEQ ID NO: 198) и LNP с ZF9-MQ1 вводили дозами по 3 мг/кг каждые пять дней. Сорафениб вводили ежедневно в дозе 50 мг/кг. Дважды в неделю измеряли длину и ширину опухолей. Объемы опухоли рассчитывали как (ширина$^2$ x длина)/2.

Из результатов видно, что обработка посредством ZF9-MQ1 подавляла рост опухоли в модели подкожной опухоли H460. Средние объемы опухоли на момент завершения исследования составляли 1921 мм$^3$, 1829 мм$^3$ и 702 мм$^3$ в группах, которых обрабатывали посредством PBS, группах, которых обрабатывали отрицательным контролем mRNA, и группах, которых обрабатывали посредством ZF09-MQ1, соответственно. Средние объемы опухолей у мышей, которых обрабатывали сорафенибом (752 мм$^3$), были неотличимы от объемов у мышей, которых обрабатывали посредством ZF9-MQ1-LNP, что указывает на то, что в данной модели ZF9-MQ1 характеризовался схожей или лучшей активностью в сравнении со средством стандартного лечения сорафенибом. Из данных результатов видно, что по сравнению с группами отрицательного контроля LNP, загруженные ZF9-MQ1, были эффективны в подавлении роста опухоли в модели подкожной опухоли H460 в условиях in vivo (фиг. 56).

**Эквиваленты**

Следует понимать, что хотя настоящее изобретение было описано совместно с его подробным описанием, предшествующее описание предназначено для иллюстрации, а не для ограничения объема настоящего изобретения, который определяется объемом прилагаемой формулы изобретения. Некоторые аспекты, преимущества и модификации входят в объем следующей формулы изобретения.

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Репрессор экспрессии, содержащий

первую нацеливающуюся функциональную группу, которая связывает геномный локус, содержащий по меньшей мере 16, 17, 18, 19 или 20 нуклеотидов из последовательности под SEQ ID NO: 83, и

первую эффекторную функциональную группу, содержащую ДНК-метилтрансферазу.

2. Репрессор экспрессии по п. 1, где первая нацеливающаяся функциональная группа содержит домен по типу "цинкового пальца".

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

4. Репрессор экспрессии по любому из предыдущих пунктов, где первая эффекторная функциональная группа содержит MQ1 или ее функциональный вариант или фрагмент.

5. Репрессор экспрессии по любому из предыдущих пунктов, где первая эффекторная функциональная группа содержит последовательность под SEQ ID NO: 19 или 87 или последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 99 или 100% идентичностью с ней или имеет не более чем 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 положение, отличающееся от нее.

6. Репрессор экспрессии по любому из предыдущих пунктов, где первая эффекторная функциональная группа содержит последовательность под SEQ ID NO: 30 или 129 или последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 99 или 100% идентичностью с ней или имеет не более чем 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 положение, отличающееся от нее.

7. Нуклеиновая кислота, кодирующая репрессор экспрессии по любому из предыдущих пунктов.

8. Нуклеиновая кислота по п. 7, которая содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую первую нацеливающуюся функциональную группу, где нуклеотидная последовательность, кодирующая первую нацеливающуюся функциональную группу, содержит последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 46 или 131 или последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 99 или 100% идентичностью с ней или имеет не более чем 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 положение, отличающееся от нее.

9. Нуклеиновая кислота по п. 7 или п. 8, которая содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую первую эффекторную функциональную группу, где нуклеотидная последовательность, кодирующая первую эффекторную функциональную группу, содержит последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 52 или 132 или

последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 99 или 100% идентичностью с ней или имеет не более чем 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 положение, отличающееся от нее.

10. Нуклеиновая кислота по любому из пп. 7-9, которая содержит нуклеотидную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 63 или 130 или последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 99 или 100% идентичностью с ней или имеет не более чем 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 положение, отличающееся от нее, где поли-А-последовательность является необязательной.

11. Система, содержащая

первый репрессор экспрессии по любому из пп. 1-6 и

второй репрессор экспрессии.

12. Система по п. 11, где второй репрессор экспрессии содержит

вторую нацеливающуюся функциональную группу, которая связывает геномный локус, и

вторую эффекторную функциональную группу.

13. Система по п. 12, где вторая нацеливающаяся функциональная группа связывает геномный локус, содержащий по меньшей мере 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 нуклеотидов из последовательности под SEQ ID NO: 77, 199 или 201.

14. Система по п. 12 или п. 13, где вторая нацеливающаяся функциональная группа содержит домен по типу "цинкового пальца".

15. Система по любому из пп. 12-14, где вторая нацеливающаяся функциональная группа содержит аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 7, 169 или 171 или последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 99 или 100% идентичностью с ней или имеет не более чем 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 положение, отличающееся от нее.

16. Система по пп. 12-15, где вторая эффекторная функциональная группа содержит KRAB или его функциональный вариант или функциональную группу.

17. Система по пп. 12-16, где вторая эффекторная функциональная группа содержит аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO:18 или последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 99 или 100% идентичностью с ней или имеет не более чем 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 положение, отличающееся от нее.

18. Система по любому из пп. 12-17, где второй репрессор экспрессии содержит аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 24, 177, 183, 179 или 185 или последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 99 или 100% идентичностью с ней или имеет не более чем 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 положение, отличающееся от нее.

19. Нуклеиновая кислота, кодирующая первый репрессор экспрессии и второй репрессор системы по любому из пп. 12-18.

20. Нуклеиновая кислота по п. 19, которая содержит нуклеотидную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 113, 196 или 197, где поли-А-последовательность является необязательной.

21. Система репрессии экспрессии, содержащая

a) первый репрессор экспрессии, содержащий

i) первую нацеливающуюся функциональную группу, содержащую аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 13 или последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 99 или 100% идентичностью с ней или имеет не более чем 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 положение, отличающееся от нее, и

ii) первую эффекторную функциональную группу, содержащую аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 19 или 87 или последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 99 или 100% идентичностью с ней или имеет не более чем 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 положение, отличающееся от нее, и

b) второй репрессор экспрессии, содержащий

i) вторую нацеливающуюся функциональную группу, содержащую аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 7 или последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 99 или 100% идентичностью с ней или имеет не более чем 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 положение, отличающееся от нее, и

ii) вторую эффекторную функциональную группу, содержащую аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO:18 или последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 99 или 100% идентичностью с ней или имеет не более чем 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 положение, отличающееся от нее.

22. Система репрессии экспрессии, содержащая

a) первый репрессор экспрессии, содержащий

i) первую нацеливающуюся функциональную группу, содержащую аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 13 или последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 99 или 100% идентичностью с ней или имеет не более чем 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 положение, отличающееся от нее, и

ii) первую эффекторную функциональную группу, содержащую аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 19 или 87 или последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 99 или 100% идентичностью с ней или имеет не более чем 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 положение, отличающееся от нее, и

b) второй репрессор экспрессии, содержащий

i) вторую нацеливающуюся функциональную группу, содержащую

аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 169, 171 или последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 99 или 100% идентичностью с ней или имеет не более чем 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 положение, отличающееся от нее, и

ii) вторую эффекторную функциональную группу, содержащую аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO:18 или последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 99 или 100% идентичностью с ней или имеет не более чем 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 положение, отличающееся от нее.

23. Система репрессии экспрессии, содержащая

a) первый репрессор экспрессии, содержащий

i) первую нацеливающуюся функциональную группу, содержащую аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 169, 171 или последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 99 или 100% идентичностью с ней или имеет не более чем 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 положение, отличающееся от нее, и

ii) первую эффекторную функциональную группу, содержащую аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 18 или последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 99 или 100% идентичностью с ней или имеет не более чем 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 положение, отличающееся от нее, и

b) второй репрессор экспрессии, содержащий

i) вторую нацеливающуюся функциональную группу, содержащую аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 13 или последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 99 или 100% идентичностью с ней или имеет не более чем 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 положение, отличающееся от нее, и

ii) вторую эффекторную функциональную группу, содержащую аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 19 или 87 или последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 99 или 100% идентичностью с ней или имеет не более чем 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 положение, отличающееся от нее.

24. Репрессор экспрессии или система репрессии экспрессии по любому из предыдущих пунктов, которые в значительной степени снижают уровень экспрессии MYC на период времени, составляющий по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25 дней или по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 клеточных делений, например, при измерении посредством ELISA.

25. Слитый белок, содержащий первую аминокислотную область, кодирующую первый репрессор экспрессии, описанный в данном документе, и вторую аминокислотную область, содержащую второй репрессор экспрессии, описанный в данном документе.

26. Репрессор экспрессии, слитый белок или система репрессии экспрессии по любому из предыдущих пунктов, где связывание репрессора экспрессии с локусом MYC в значительной степени снижает экспрессию MYC через 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36, 40, 44, 48, 52, 56, 60, 64, 68, 72, 76, 80 или 96 часов после трансфекции репрессором экспрессии или системой репрессии экспрессии.

27. Репрессор экспрессии, слитый белок или система репрессии экспрессии по любому из предыдущих пунктов, где приведение множества клеток в контакт с репрессором экспрессии, системой репрессора экспрессии или нуклеиновой кислотой, кодирующей репрессор экспрессии или первый репрессор экспрессии и второй репрессор экспрессии, снижает жизнеспособность множества клеток.

28. Репрессор экспрессии, слитый белок или система репрессии экспрессии по любому из предыдущих пунктов, где введение репрессора экспрессии или системы репрессии экспрессии приводит к апоптозу по меньшей мере 5%, 6%, 7%, 8%, 9% 10%, 12%, 15%, 17% 20%, 25% 30%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 75% клеток-мишеней (например, раковых клеток).

29. Репрессор экспрессии, слитый белок или система репрессии экспрессии по п. 17d, где множество клеток содержит множество раковых клеток и множество нераковых клеток.

30. Репрессор экспрессии, слитый белок или система репрессии экспрессии по п. 17e, где приведение множества клеток в контакт с системой или нуклеиновой кислотой, кодирующей систему, снижает жизнеспособность множества раковых клеток в большей степени, чем снижает жизнеспособность множества нераковых клеток, где необязательно жизнеспособность множества раковых клеток снижается в 1,05x (т. е. 1,05 раза), 1,1x, 1,15x, 1,2x, 1,25x, 1,3x, 1,35x, 1,4x, 1,45x, 1,5x, 1,6x, 1,7x, 1,8x, 1,9x, 2x, 3x, 4x, 5x, 6x, 7x, 8x, 9x, 10x, 20x, 50x или 100x больше, чем жизнеспособность множества нераковых клеток.

31. Нуклеиновая кислота, содержащая последовательность, кодирующую репрессор экспрессии, слитый белок или систему по любому из пп. 1-30.

32. Нуклеиновая кислота, кодирующая систему репрессии экспрессии, при этом нуклеиновая кислота содержит

a) первую область, кодирующую первый репрессор экспрессии, при этом первый репрессор экспрессии содержит

i) первую нацеливающуюся функциональную группу, содержащую аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 13 или последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 99 или 100% идентичностью с ней или имеет не более чем 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 положение, отличающееся от нее, и

ii) первую эффекторную функциональную группу, содержащую аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 19 или 87 или последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 99 или 100% идентичностью с

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

b) вторую область, кодирующую второй репрессор экспрессии, при этом второй репрессор экспрессии содержит

i) вторую нацеливающуюся функциональную группу, содержащую аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 7 или последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 99 или 100% идентичностью с ней или имеет не более чем 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 положение, отличающееся от нее, и

ii) вторую эффекторную функциональную группу, содержащую аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO:18 или последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 99 или 100% идентичностью с ней или имеет не более чем 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 положение, отличающееся от нее.

33. Нуклеиновая кислота, кодирующая систему репрессии экспрессии, при этом нуклеиновая кислота содержит

a) первую область, кодирующую первый репрессор экспрессии, при этом первый репрессор экспрессии содержит

i) первую нацеливающуюся функциональную группу, содержащую аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 13 или последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 99 или 100% идентичностью с ней или имеет не более чем 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 положение, отличающееся от нее, и

ii) первую эффекторную функциональную группу, содержащую аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 19 или 87 или последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 99 или 100% идентичностью с ней или имеет не более чем 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 положение, отличающееся от нее, и

b) вторую область, кодирующую второй репрессор экспрессии, при этом второй репрессор экспрессии содержит

i) вторую нацеливающуюся функциональную группу, содержащую аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 169, 171 или последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 99 или 100% идентичностью с ней или имеет не более чем 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 положение, отличающееся от нее, и

ii) вторую эффекторную функциональную группу, содержащую аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO:18 или последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 99 или 100% идентичностью с ней или имеет не более чем 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 положение, отличающееся от нее.

34. Нуклеиновая кислота, кодирующая систему репрессии экспрессии, при этом нуклеиновая кислота содержит

a) первую область, кодирующую первый репрессор экспрессии, при этом первый репрессор экспрессии содержит

i) первую нацеливающуюся функциональную группу, содержащую аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 169, 171 или последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 99 или 100% идентичностью с ней или имеет не более чем 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 положение, отличающееся от нее, и

ii) первую эффекторную функциональную группу, содержащую аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 18 или последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 99 или 100% идентичностью с ней или имеет не более чем 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 положение, отличающееся от нее, и

b) вторую область, кодирующую второй репрессор экспрессии, при этом второй репрессор экспрессии содержит

i) вторую нацеливающуюся функциональную группу, содержащую аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 13 или последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 99 или 100% идентичностью с ней или имеет не более чем 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 положение, отличающееся от нее, и

ii) вторую эффекторную функциональную группу, содержащую аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO:19 или 87 или последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 99 или 100% идентичностью с ней или имеет не более чем 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 положение, отличающееся от нее.

35. Нуклеиновая кислота по любому из пп. 19, 21 или п. 22, которая содержит нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 93, 94, 112, 113, 196, 197 или последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95 или 99% идентичностью с ней, или последовательность, которая имеет не более чем 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 положение, отличающееся от нее.

36. Репрессор экспрессии, содержащий

нацеливающуюся функциональную группу, которая связывает геномный локус, содержащий по меньшей мере 16, 17, 18, 19 или 20 нуклеотидов из последовательности из таблицы 12, и

необязательно эффекторную функциональную группу.

37. Репрессор экспрессии, содержащий

нацеливающуюся функциональную группу, содержащую аминокислотную последовательность в соответствии с таблицей 4 или последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 99 или 100% идентичностью с ней или

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

необязательно эффекторную функциональную группу.

38. Репрессор экспрессии по п. 37, который содержит аминокислотную последовательность в соответствии с таблицей 7 или таблицей 9 или последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 99 или 100% идентичностью с ней или имеет не более чем 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 положение, отличающееся от нее.

39. Нуклеиновая кислота, содержащая последовательность в соответствии с таблицей 5, таблицей 6, таблицей 8, таблицей 16 или таблицей 10 или последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 99 или 100% идентичностью с ней или имеет не более чем 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 положение, отличающееся от нее.

40. Вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую слитый белок, систему или репрессор экспрессии по любому из предыдущих пунктов.

41. Реакционная смесь, содержащая репрессор экспрессии, систему, слитый белок, нуклеиновую кислоту или вектор по любому из предыдущих пунктов.

42. Фармацевтическая композиция, содержащая репрессор экспрессии, систему, слитый белок, нуклеиновую кислоту, вектор или реакционную смесь по любому из предыдущих пунктов.

43. Способ лечения рака у нуждающегося в этом субъекта, при этом способ включает

введение репрессора экспрессии, системы, слитого белка или нуклеиновой кислоты, кодирующей репрессор экспрессии или систему, по любому из пп. 1-20.

44. Способ по п. 43, где рак представляет собой гепатоклеточную карциному (HCC), фиброламеллярную гепатоклеточную карциному (FHCC), холангиокарциному, ангиосаркому, вторичный рак печени, рак легкого, немелкоклеточный рак легкого (NSCLC), аденокарциному, мелкоклеточный рак легкого (SCLC), крупноклеточную (недифференцированную) карциному, трижды негативный рак молочной железы, аденокарциному желудка, карциному эндометрия или карциному поджелудочной железы.

45. Способ лечения гепатита у нуждающегося в этом субъекта, при этом способ включает

введение репрессора экспрессии, слитого белка, системы или нуклеиновой кислоты, кодирующей репрессор экспрессии или систему, по любому из пп. 1-42.

46. Способ уменьшения роста опухоли у нуждающегося в этом субъекта, при этом способ включает

введение субъекту репрессора экспрессии, слитого белка, системы, нуклеиновой кислоты, вектора или фармацевтической композиции по любому из пп. 1-42,

с уменьшением тем самым роста опухоли у субъекта.

47. Способ повышения или восстановления чувствительности рака к ингибитору

киназы, например сорафенибу, при этом способ включает введение репрессора экспрессии или системы по любому из пп. 1-42 субъекту, у которого имеется рак, где необязательно введение репрессора экспрессии или системы снижает $IC_{50}$ ингибитора киназы на 10%, 20%, 30% или 40%, например при анализе жизнеспособности раковых клеток.

48. Способ повышения или восстановления чувствительности рака к ингибитору бромодомена, например ингибитору BET, например JQ1, при этом способ включает введение репрессора экспрессии или системы по любому из пп. 1-42 субъекту, у которого имеется рак, где необязательно введение репрессора экспрессии или системы снижает $IC_{50}$ ингибитора бромодомена на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или 95%, например при анализе жизнеспособности раковых клеток.

49. Способ повышения или восстановления чувствительности рака к ингибитору MEK, например траметинибу, при этом способ включает введение репрессора экспрессии или системы по любому из пп. 1-42 субъекту, у которого имеется рак, где необязательно введение репрессора экспрессии или системы снижает $IC_{50}$ ингибитора MEK на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или 95%, например при анализе жизнеспособности раковых клеток.

50. Способ по любому из пп. 43-49, где рак характеризуется наличием клеток, характеризующихся повышенной экспрессией MYC по сравнению с эталонным уровнем (например, по сравнению с экспрессией MYC в эталонной клетке, например аналогичной в остальном отношении нераковой клетке субъекта), и клеток, не характеризующихся повышенной экспрессией MYC по сравнению с эталонным уровнем (например, по сравнению с экспрессией MYC в эталонной клетке, например аналогичной в остальном отношении нераковой клеткой субъекта), например, имеющих нормальную экспрессию MYC.

51. Способ по любому из пп. 43-50, включающий

a) во-первых, введение субъекту первого множества доз репрессора экспрессии или системы по любому из пунктов _____, где необязательно каждую последующую дозу в первом множестве вводят через 5 дней после предыдущей дозы в первом множестве;

b) во-вторых, отмену репрессора экспрессии или системы на некоторый период времени ("лекарственные каникулы"), например на приблизительно 2 недели, и

c) в-третьих, введение субъекту второго множества доз репрессора экспрессии или системы, где необязательно последующую дозу во втором множестве вводят через 5 дней после предыдущей дозы во втором множестве.

52. Способ по любому из пп. 43-51, где объем опухоли снижается (например, до невыявляемого уровня) после прекращения лечения репрессором экспрессии, слитым белком или системой.

53. Способ по любому из пп. 43-52, где способ дополнительно включает

a. приведение клетки в контакт со вторым терапевтическим средством или

b. введение субъекту второго терапевтического средства, где необязательно второе терапевтическое средство не является репрессором экспрессии, системой, слитым белком,

нуклеиновой кислотой, вектором, реакционной смесью или фармацевтической композицией по любому из пп.__.

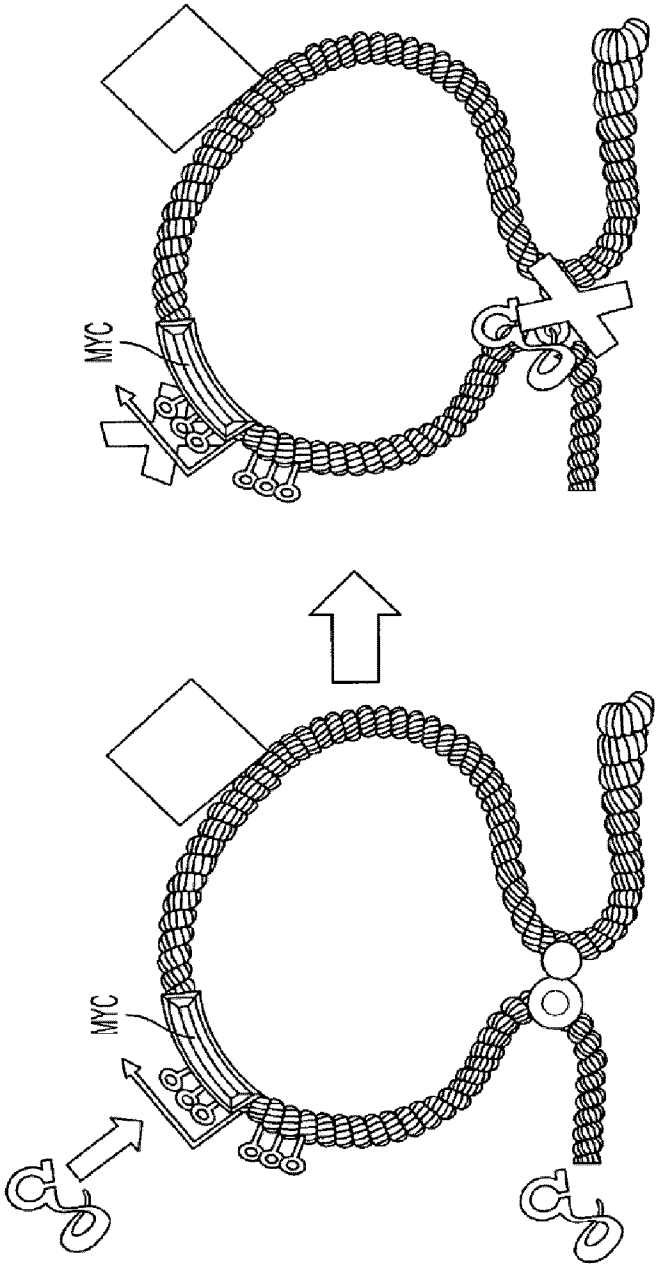
54. Способ по любому из пп. 43-53, где второе терапевтическое средство представляет собой средство иммунотерапии, одно или оба из средств терапии на основе иммунных контрольных точек и ингибитора фактора роста эндотелия сосудов, средство системной химиотерапии, ингибитор тирозинкиназы, например сорафениб, ингибитор митоген-активируемой протеинкиназы, например траметиниб, или ингибитор бромодомена, например ингибитор BET, например JQ1, например бирабресиб.

55. Способ по любому из пп. 43-54, где первое и второе терапевтические средства вводят одновременно.

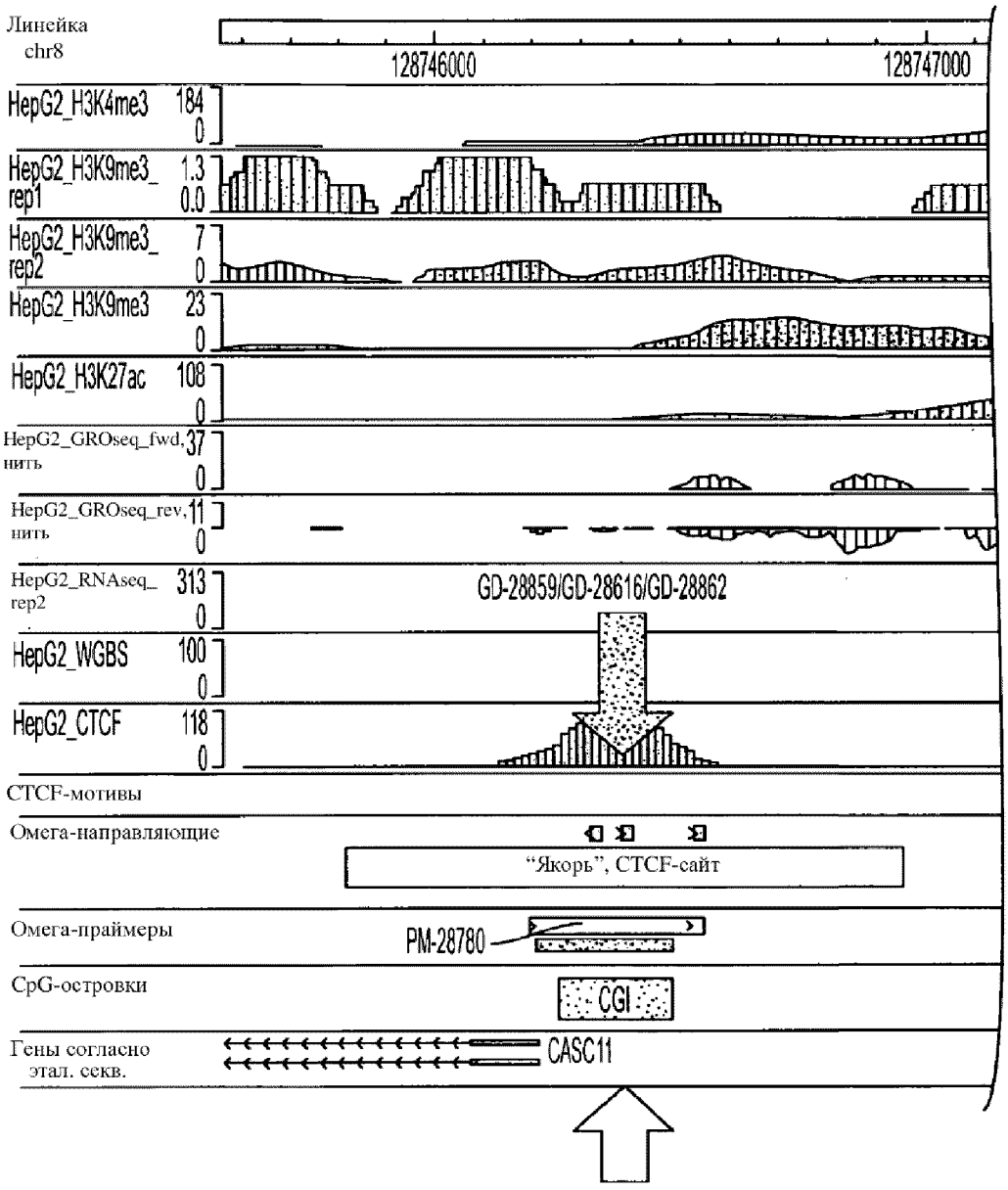
56. Способ по любому из пп. 43-55, где первое и второе терапевтические средства вводят последовательно.

57. Способ по любому из пп. 43-56, где у субъекта имеется сверхэкспрессия MYC в по меньшей мере некоторых клетках.

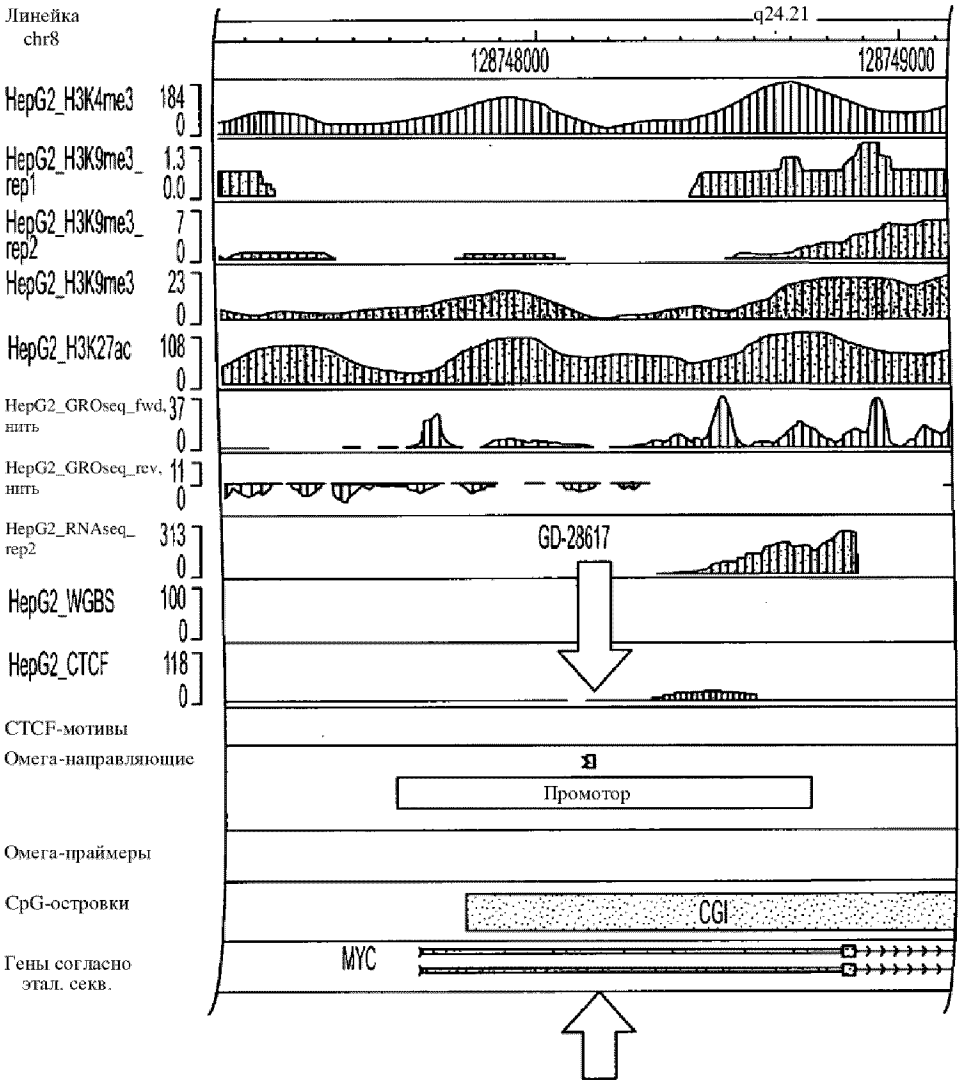
По доверенности



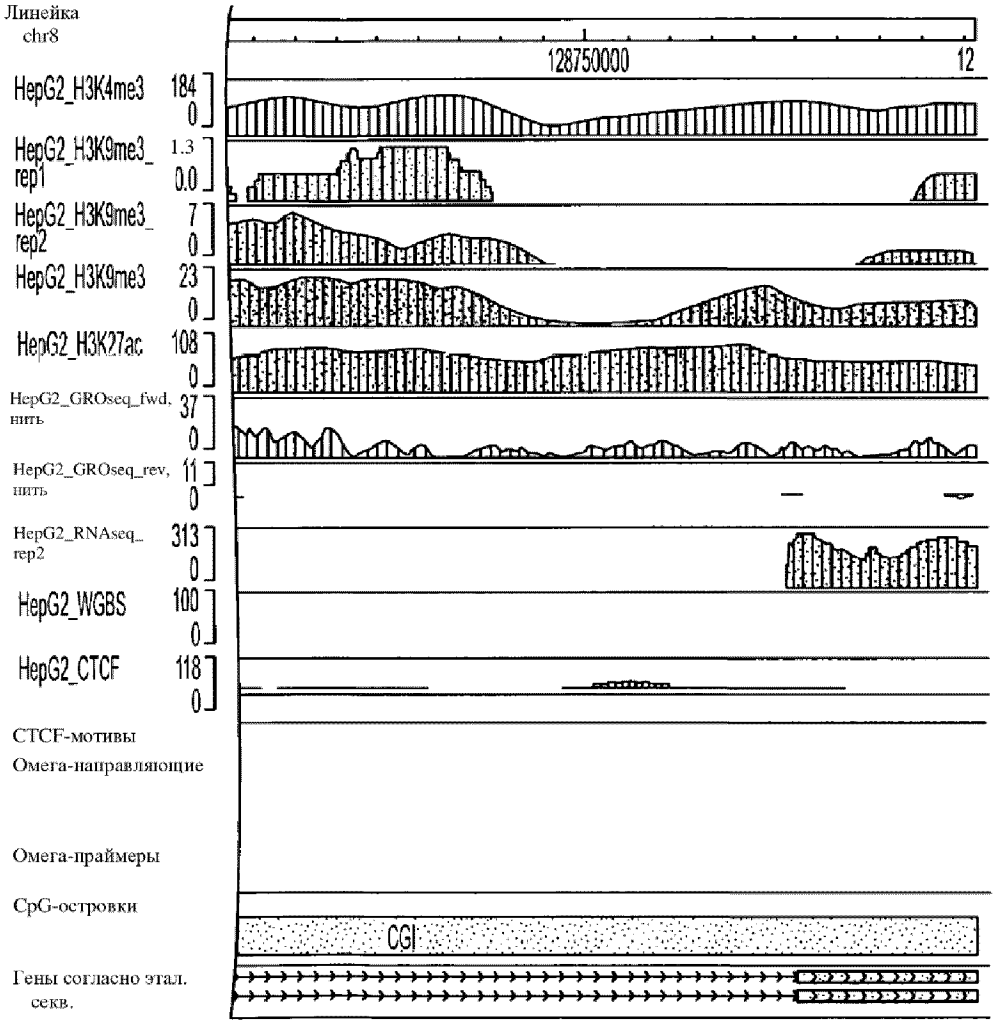

ФИГ. 1А


Линейка
chr8
128746000
128747000
HepG2_H3K4me3
184
0
HepG2_H3K9me3_
rep1
1.3
0.0
HepG2_H3K9me3_
rep2
7
0
HepG2_H3K9me3
23
0
HepG2_H3K27ac
108
0
HepG2_GROseq_fwd,
нить
37
0
HepG2_GROseq_rev,
нить
11
0
HepG2_RNAseq_
rep2
313
0
GD-28859/GD-28616/GD-28862
HepG2_WGBS
100
0
HepG2_CTCF
118
0
CTCF-мотивы
Омега-направляющие
"Якорь", CTCF-сайт
Омега-праймеры
PM-28780
CpG-островки
CGI
Гены согласно
этал. секв.
CASC11

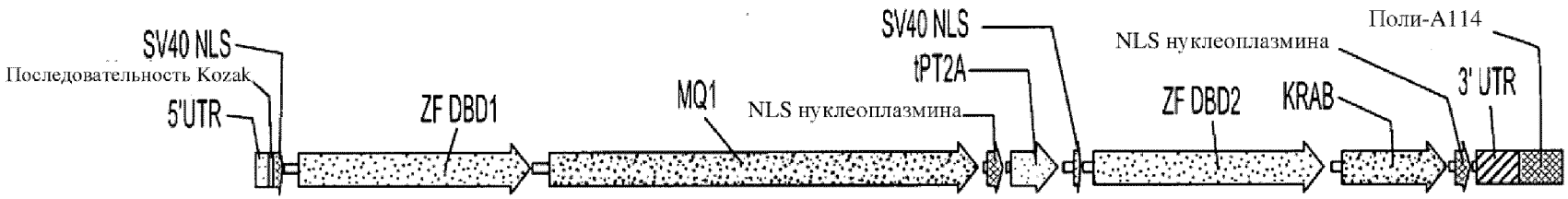
ФИГ. 1B



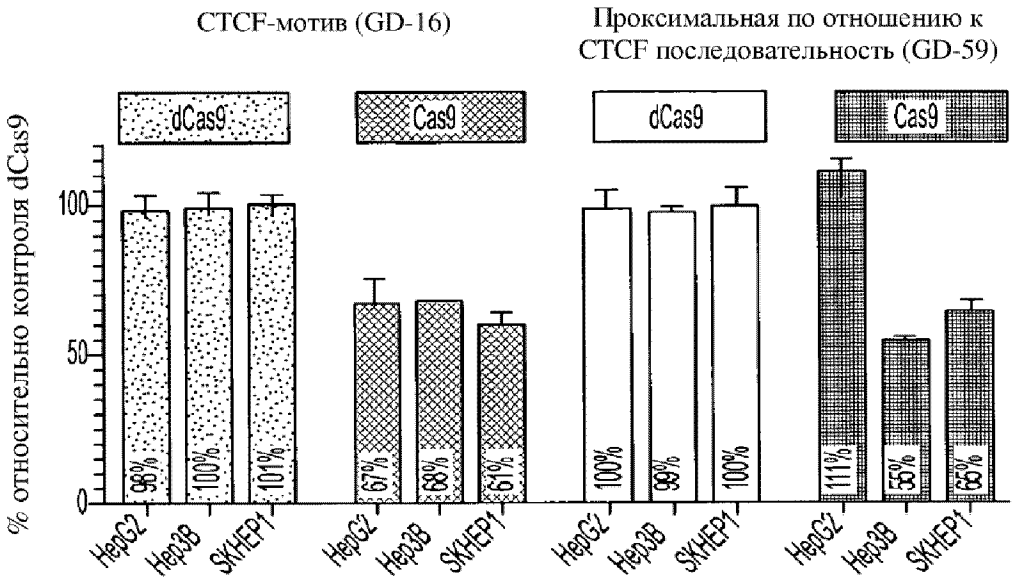

ФИГ. 1B,
продолжение




ФИГ. 1В,
продолжение


SV40 NLS
Последовательность Kozak
5'UTR
ZF DBD1
MQ1
NLS нуклеоплазмина
SV40 NLS
tPT2A
ZF DBD2
KRAB
NLS нуклеоплазмина
Поли-A114
3' UTR

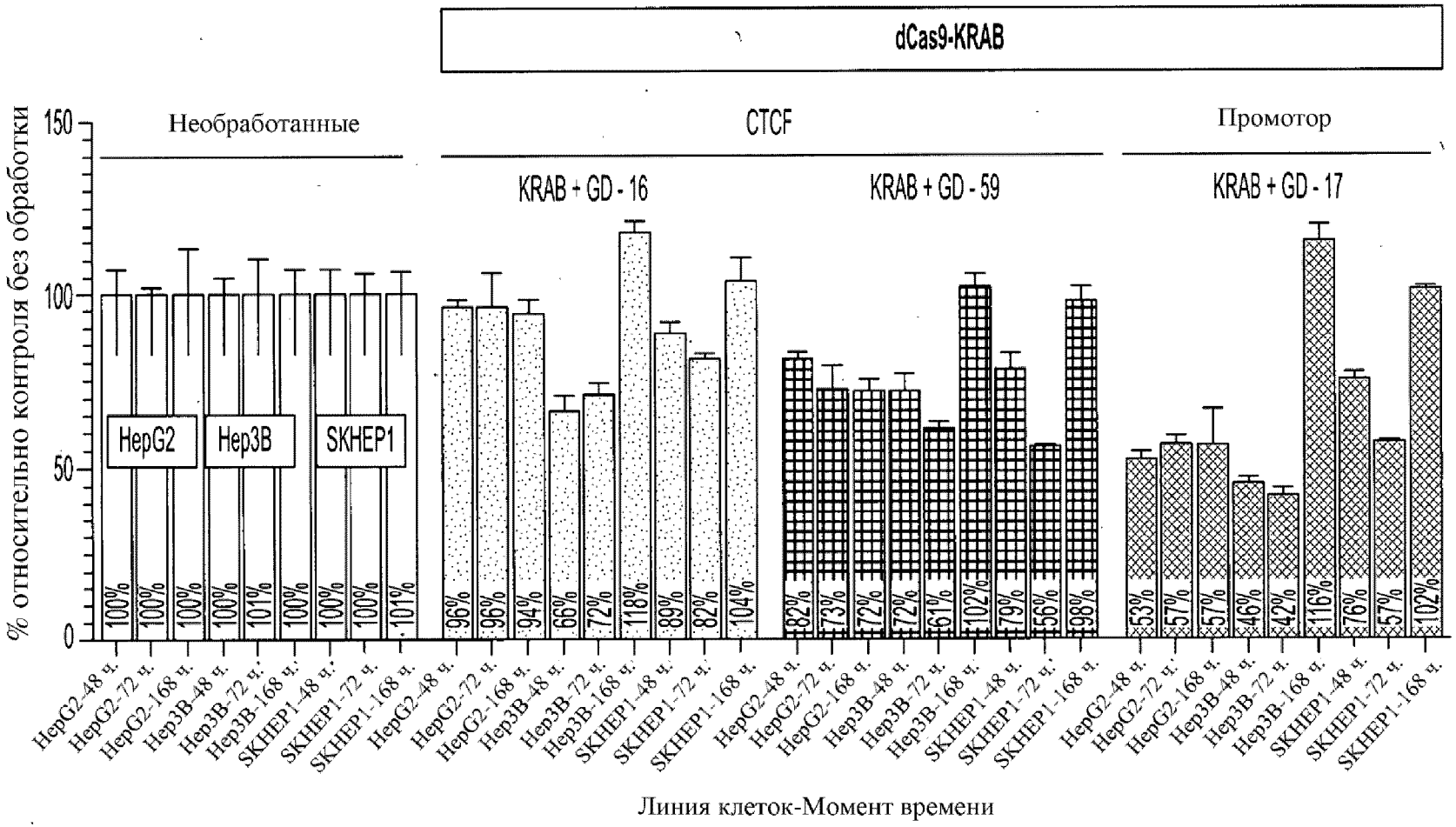
ФИГ. 1C



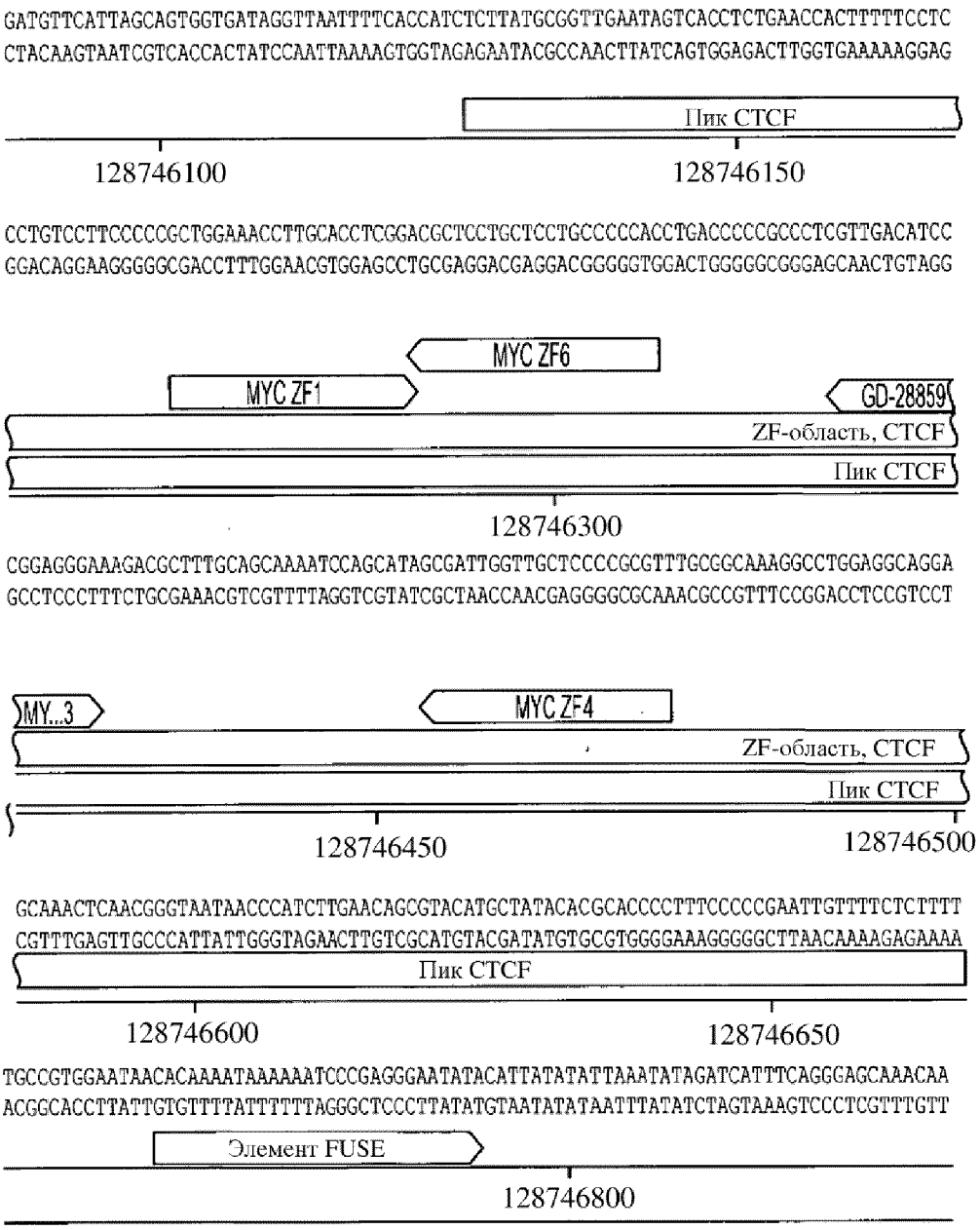

ФИГ. 2А

| | | | GD-16 | GD-59 |
|---|---|---|---|---|
| | Тип клеток | Повтор | Процент редактирования | |
| Cas9 | HEPG2 | Лунка 1 | 96 | 99 |
| | HEPG2 | Лунка 2 | 94 | 100 |
| | HEPG2 | Лунка 3 | 95 | 100 |
| | SK-HEP-1 | Лунка 1 | 77 | 99 |
| | SK-HEP-1 | Лунка 2 | 80 | 99 |
| | SK-HEP-1 | Лунка 3 | 80 | 99 |
| | HEP3B | Лунка 1 | 94 | 97 |
| | HEP3B | Лунка 2 | 96 | 99 |
| | HEP3B | Лунка 3 | 95 | 98 |

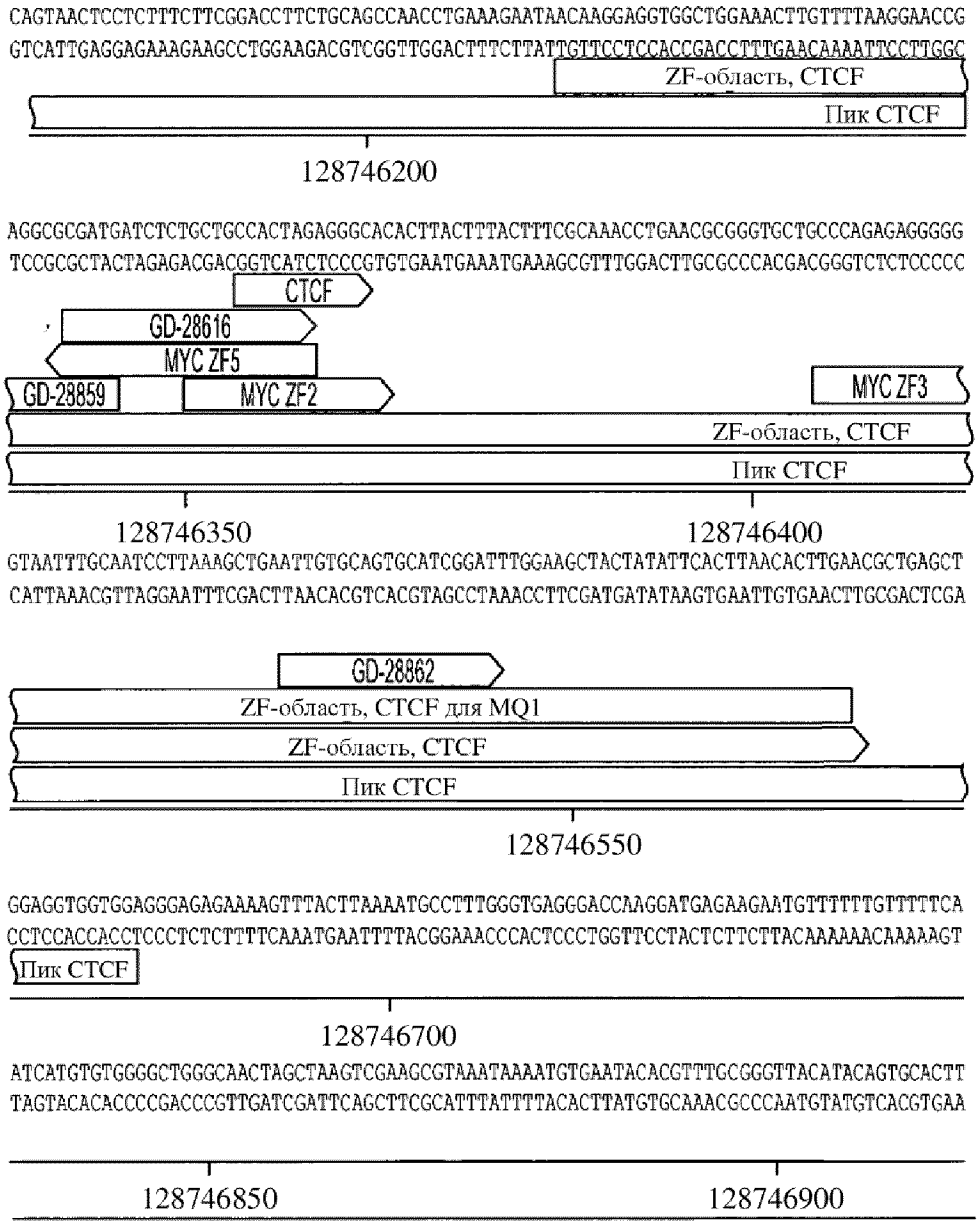
ФИГ. 2В


dCas9-KRAB
Необработанные
CTCF
Промотор
KRAB + GD - 16
KRAB + GD - 59
KRAB + GD - 17
% относительно контроля без обработки
150
100
50
0
HepG2
Hep3B
SKHEP1
100%
96%
82%
53%
Линия клеток-Момент времени

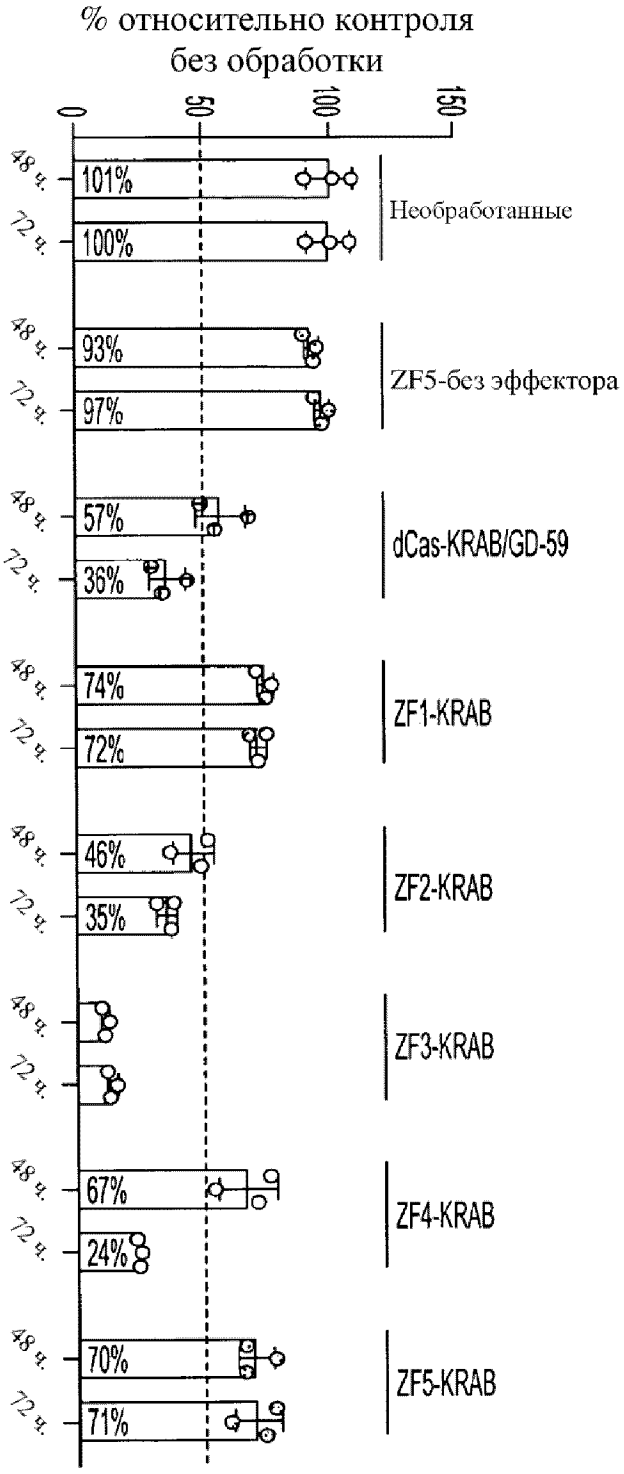
ФИГ. 3


GATGTTCATTAGCAGTGGTGATAGGTTAATTTTCACCATCTCTTATGCGGTTGAATAGTCACCTCTGAACCACTTTTTCCTC
CTACAAGTAATCGTCACCACTATCCAATTAAAAGTGGTAGAGAATACGCCAACTTATCAGTGGAGACTTGGTGAAAAAGGAG
Пик CTCF
128746100
128746150
CCTGTCCTTCCCCCGCTGGAAACCTTGCACCTCGGACGCTCCTGCTCCTGCCCCCACCTGACCCCCGCCCTCGTTGACATCC
GGACAGGAAGGGGGCGACCTTTGGAACGTGGAGCCTGCGAGGACGAGGACGGGGGTGGACTGGGGGCGGGAGCAACTGTAGG
MYC ZF6
MYC ZF1
GD-28859
ZF-область, CTCF
Пик CTCF
128746300
CGGAGGGAAAGACGCTTTGCAGCAAAATCCAGCATAGCGATTGGTTGCTCCCCGCGTTTGCGGCAAAGGCCTGGAGGCAGGA
GCCTCCCTTTCTGCGAAACGTCGTTTTAGGTCGTATCGCTAACCAACGAGGGGCGCAAACGCCGTTTCCGGACCTCCGTCCT
MY...3
MYC ZF4
ZF-область, CTCF
Пик CTCF
128746450
128746500
GCAAACTCAACGGGTAATAACCCATCTTGAACAGCGTACATGCTATACACGCACCCCTTTCCCCCGAATTGTTTTCTCTTTT
CGTTTGAGTTGCCCATTATTGGGTAGAACTTGTCGCATGTACGATATGTGCGTGGGGAAAGGGGGCTTAACAAAAGAGAAAA
Пик CTCF
128746600
128746650
TGCCGTGGAATAACACAAAATAAAAAATCCCGAGGGAATATACATTATATATTAAATATAGATCATTTCAGGGAGCAAACAA
ACGGCACCTTATTGTGTTTTATTTTTTAGGGCTCCCTTATATGTAATATATAATTTATATCTAGTAAAGTCCCTCGTTTGTT
Элемент FUSE
128746800

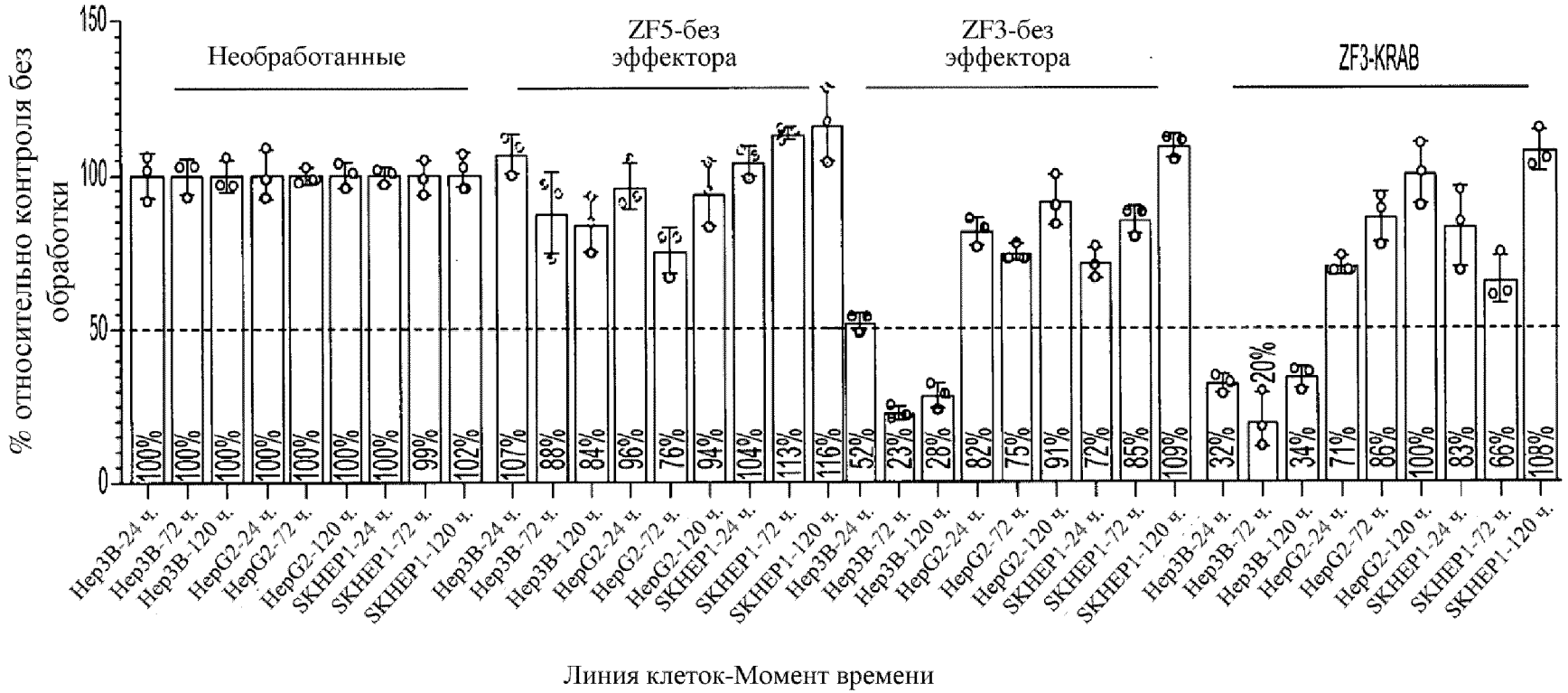
ФИГ. 4А



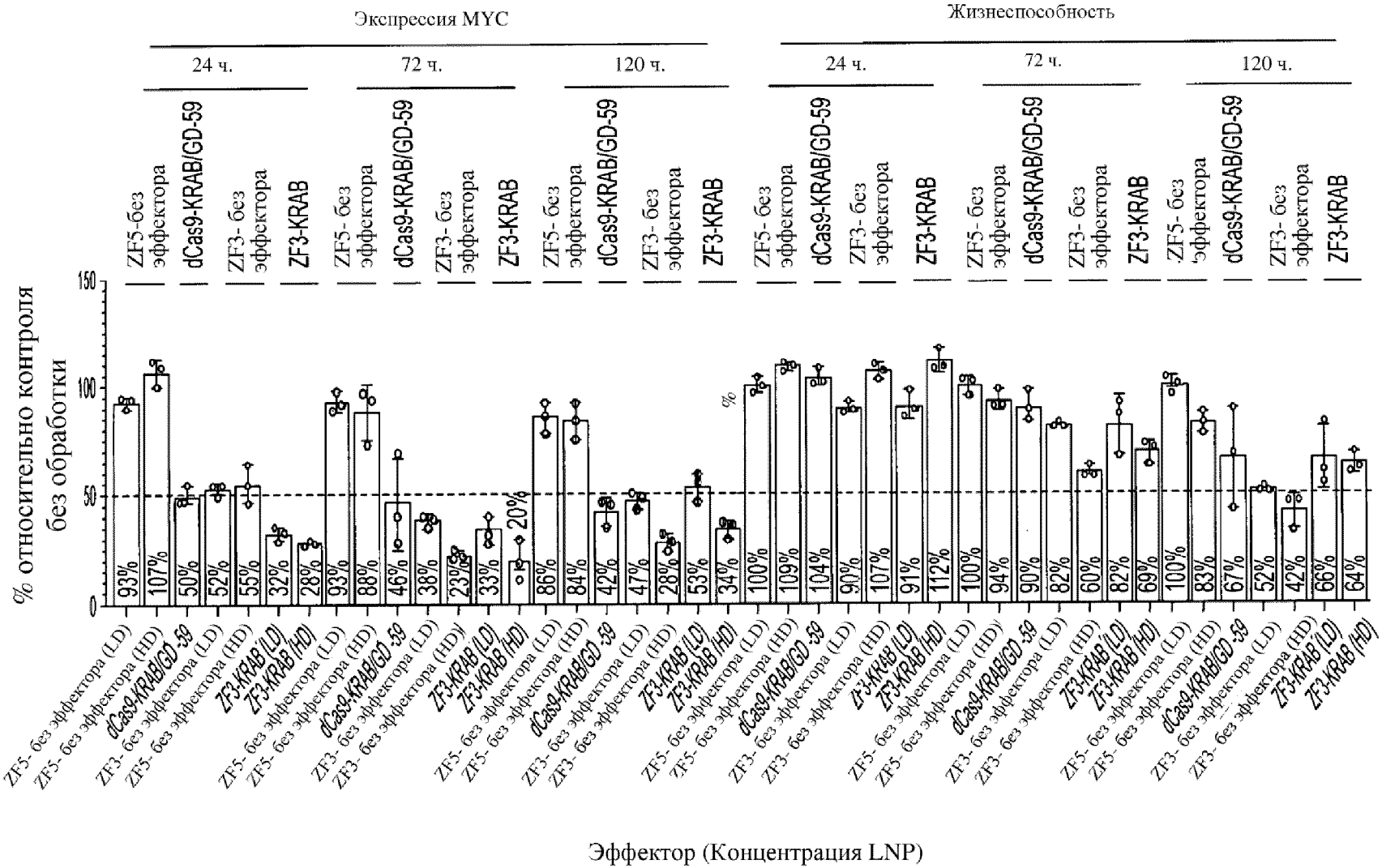

ФИГ. 4А,
продолжение


% относительно контроля
без обработки
0
50
100
150
48 ч.
72 ч.
101%
100%
Необработанные
93%
97%
ZF5-без эффектора
57%
36%
dCas-KRAB/GD-59
74%
72%
ZF1-KRAB
46%
35%
ZF2-KRAB
ZF3-KRAB
67%
24%
ZF4-KRAB
70%
71%
ZF5-KRAB

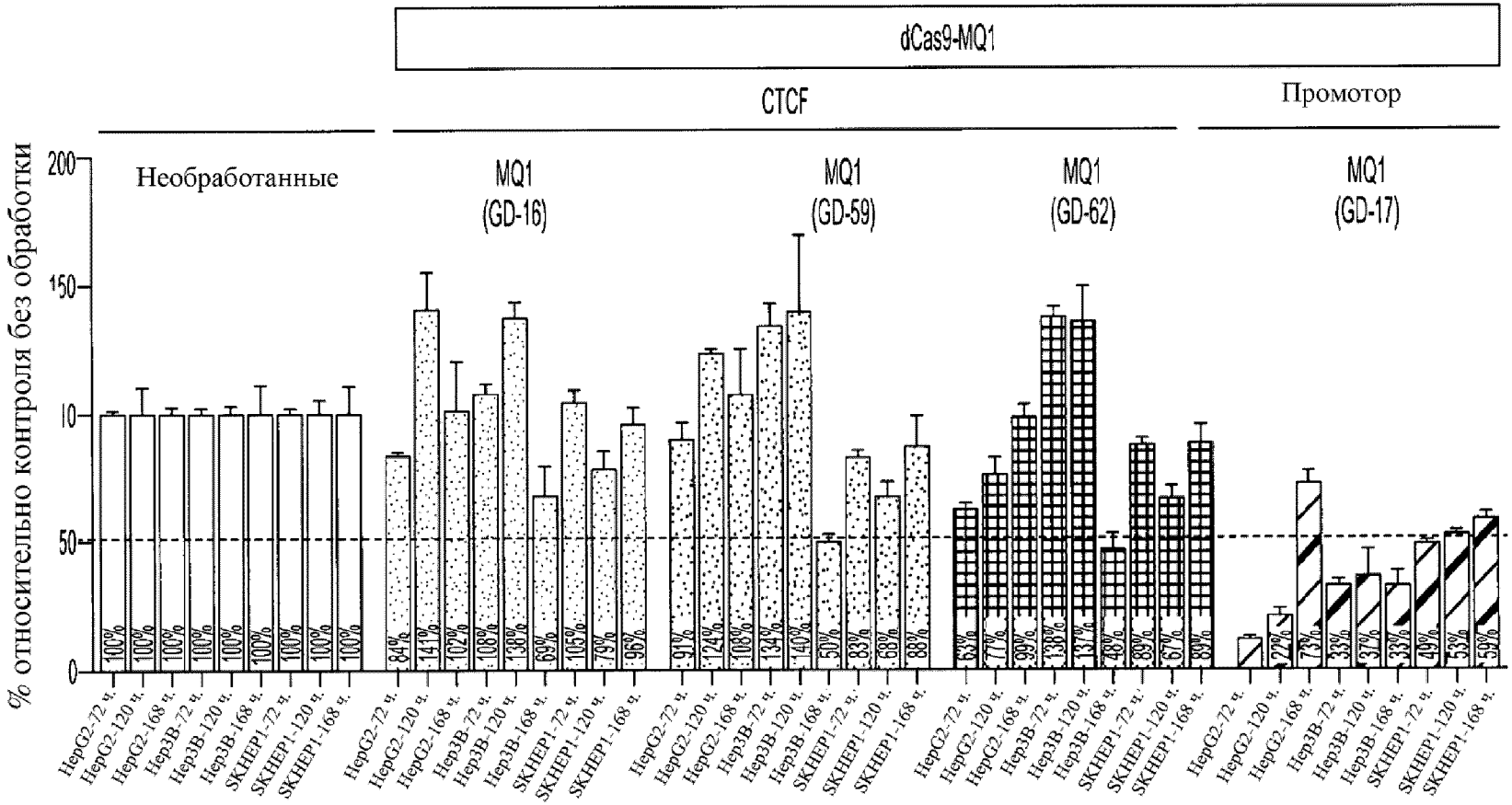
ФИГ. 4В


% относительно контроля без обработки
150
100
50
0
Необработанные
ZF5-без эффектора
ZF3-без эффектора
ZF3-KRAB
100%
100%
100%
100%
100%
100%
100%
99%
102%
107%
88%
84%
96%
76%
94%
104%
113%
116%
52%
23%
28%
82%
75%
91%
72%
85%
109%
32%
20%
34%
71%
86%
100%
83%
66%
108%
Hep3B-24 ч.
Hep3B-72 ч.
Hep3B-120 ч.
HepG2-24 ч.
HepG2-72 ч.
HepG2-120 ч.
SKHEP1-24 ч.
SKHEP1-72 ч.
SKHEP1-120 ч.
Линия клеток-Момент времени

ФИГ. 4С

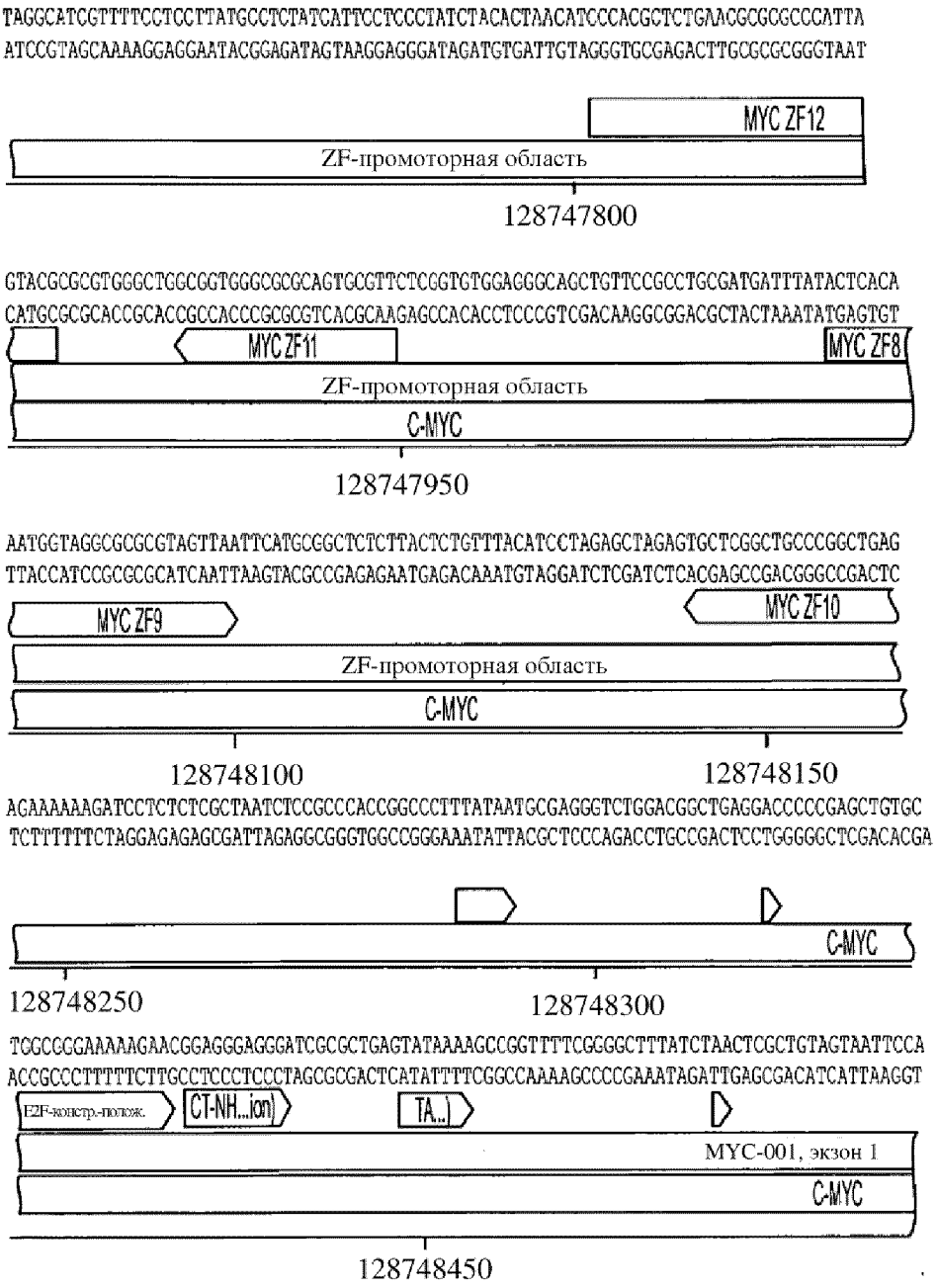

Экспрессия MYC
Жизнеспособность
24 ч.
72 ч.
120 ч.
ZF5-без эффектора
dCas9-KRAB/GD-59
ZF3- без эффектора
ZF3-KRAB
% относительно контроля без обработки
Эффектор (Концентрация LNP)

ФИГ. 4D

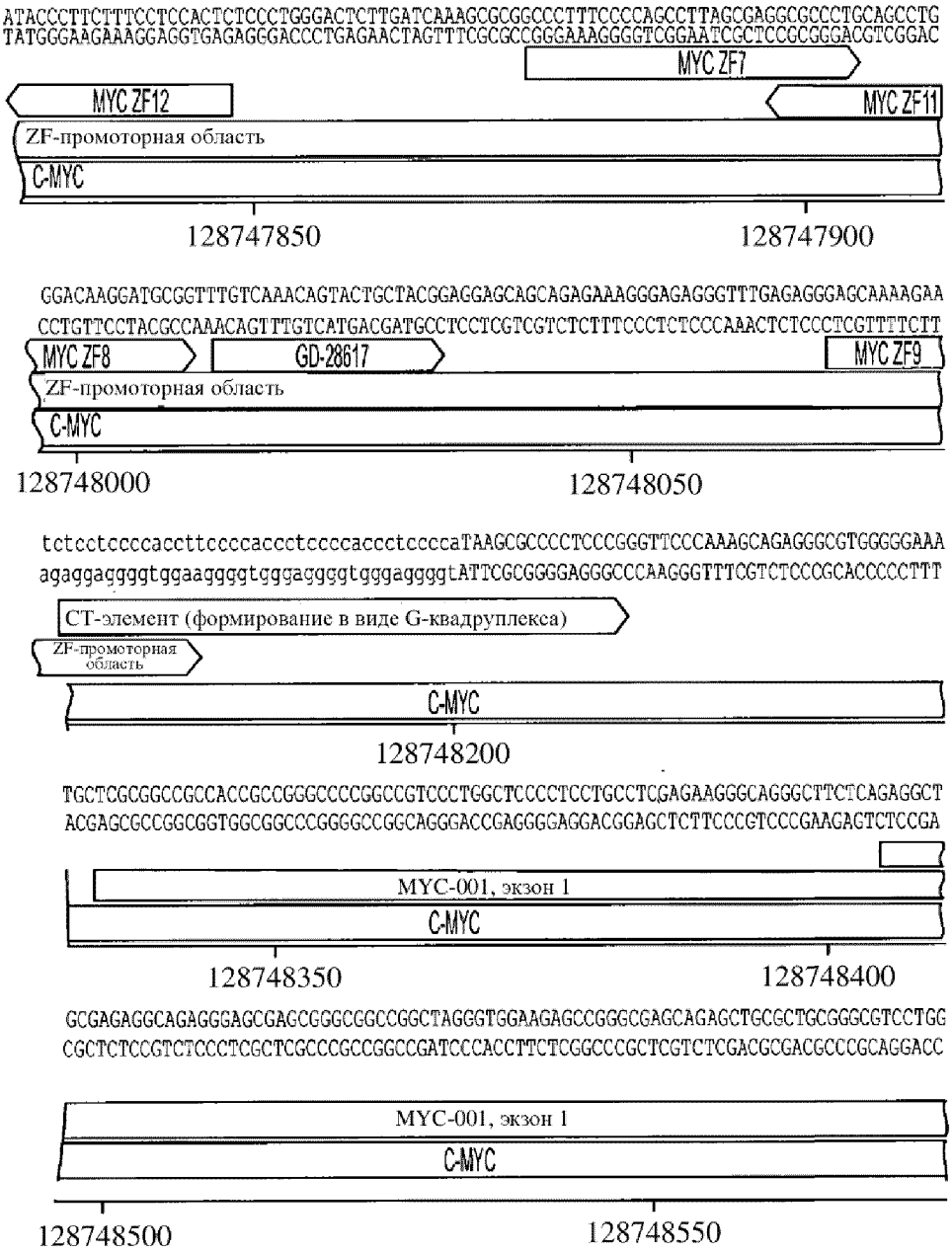



Линия клеток-Момент времени

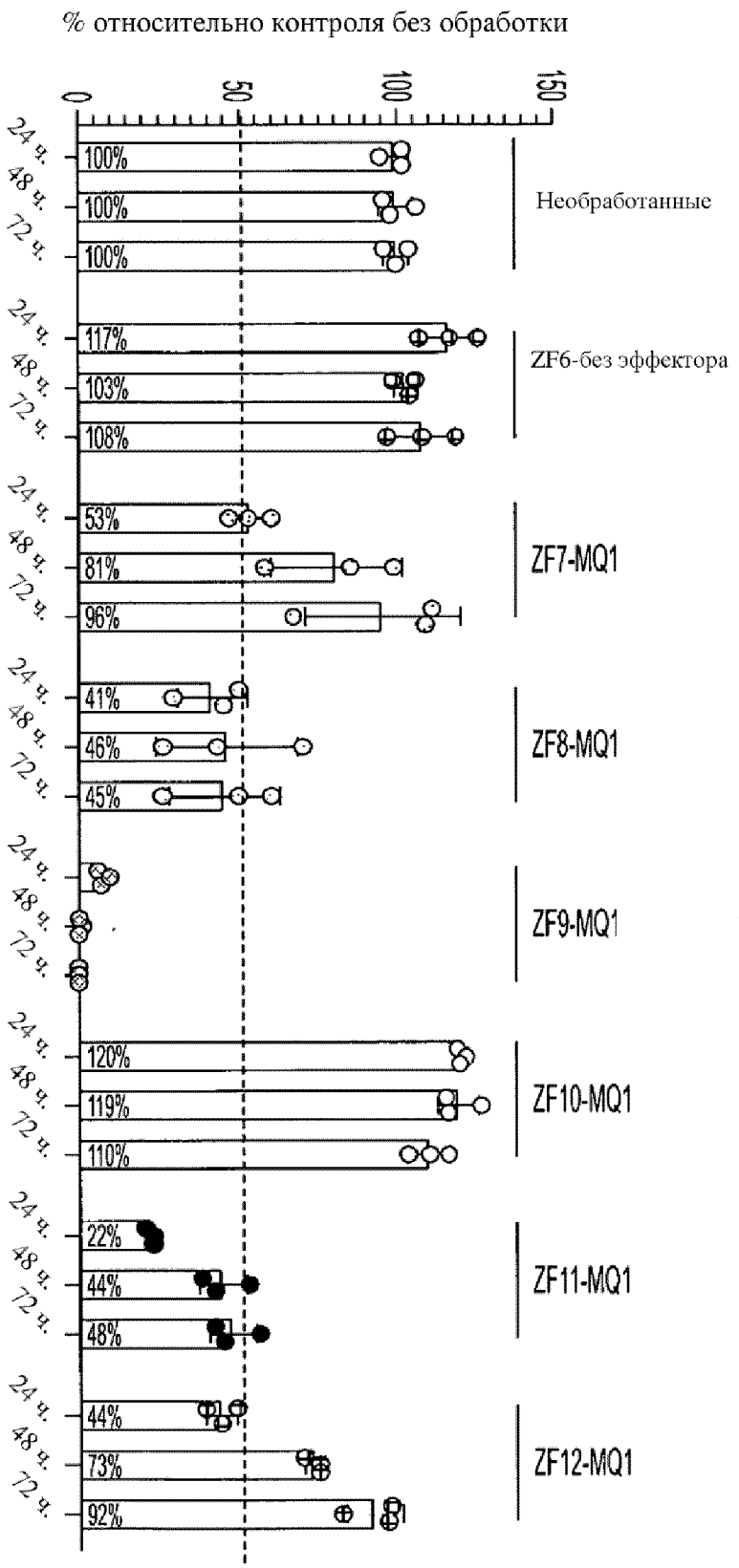
ФИГ. 5


TAGGCATCGTTTTCCTCCTTATGCCTCTATCATTCCTCCCTATCTACACTAACATCCCACGCTCTGAACGCGCGCCCATTA
ATCCGTAGCAAAAGGAGGAATACGGAGATAGTAAGGAGGGATAGATGTGATTGTAGGGTGCGAGACTTGCGCGCGGGTAAT
MYC ZF12
ZF-промоторная область
128747800
GTACGCGCGTGGGCTGGCGGTGGGCGCGCAGTGCGTTCTCGGTGTGGAGGGCAGCTGTTCCGCCTGCGATGATTTATACTCACA
CATGCGCGCACCGCACCGCCACCCGCGCGTCACGCAAGAGCCACACCTCCCGTCGACAAGGCGGACGCTACTAAATATGAGTGT
MYC ZF11
MYC ZF8
ZF-промоторная область
C-MYC
128747950
AATGGTAGGCGCGCGTAGTTAATTCATGCGGCTCTCTTACTCTGTTTACATCCTAGAGCTAGAGTGCTCGGCTGCCCGGCTGAG
TTACCATCCGCGCGCATCAATTAAGTACGCCGAGAGAATGAGACAAATGTAGGATCTCGATCTCACGAGCCGACGGGCCGACTC
MYC ZF9
MYC ZF10
ZF-промоторная область
C-MYC
128748100
128748150
AGAAAAAAGATCCTCTCTCGCTAATCTCCGCCCACCGGCCCTTTATAATGCGAGGGTCTGGACGGCTGAGGACCCCCGAGCTGTGC
TCTTTTTTCTAGGAGAGAGCGATTAGAGGCGGGTGGCCGGGAAATATTACGCTCCCAGACCTGCCGACTCCTGGGGGCTCGACACGA
C-MYC
128748250
128748300
TGGCGCGAAAAAGAACGGAGGGAGGGATCGCGCTGAGTATAAAAGCCGGTTTTCGGGGCTTTATCTAACTCGCTGTAGTAATTCCA
ACCGCCCTTTTTCTTGCCTCCCTCCCTAGCGCGACTCATATTTTCGGCCAAAAGCCCCGAAATAGATTGAGCGACATCATTAAGGT
E2F-констр.-полож.
CT-NH...ion)
TA...)
MYC-001, экзон 1
C-MYC
128748450

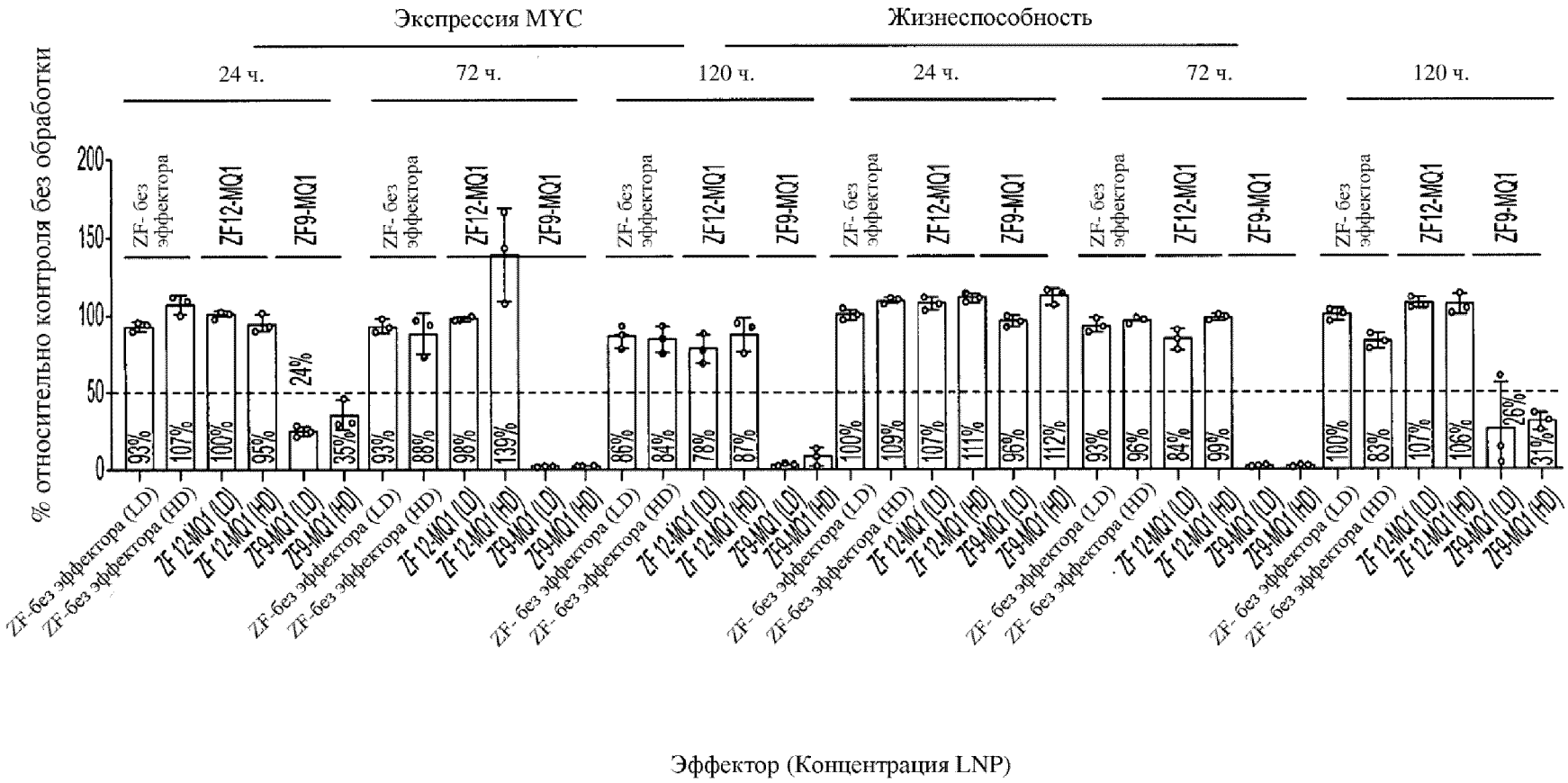
ФИГ. 6А



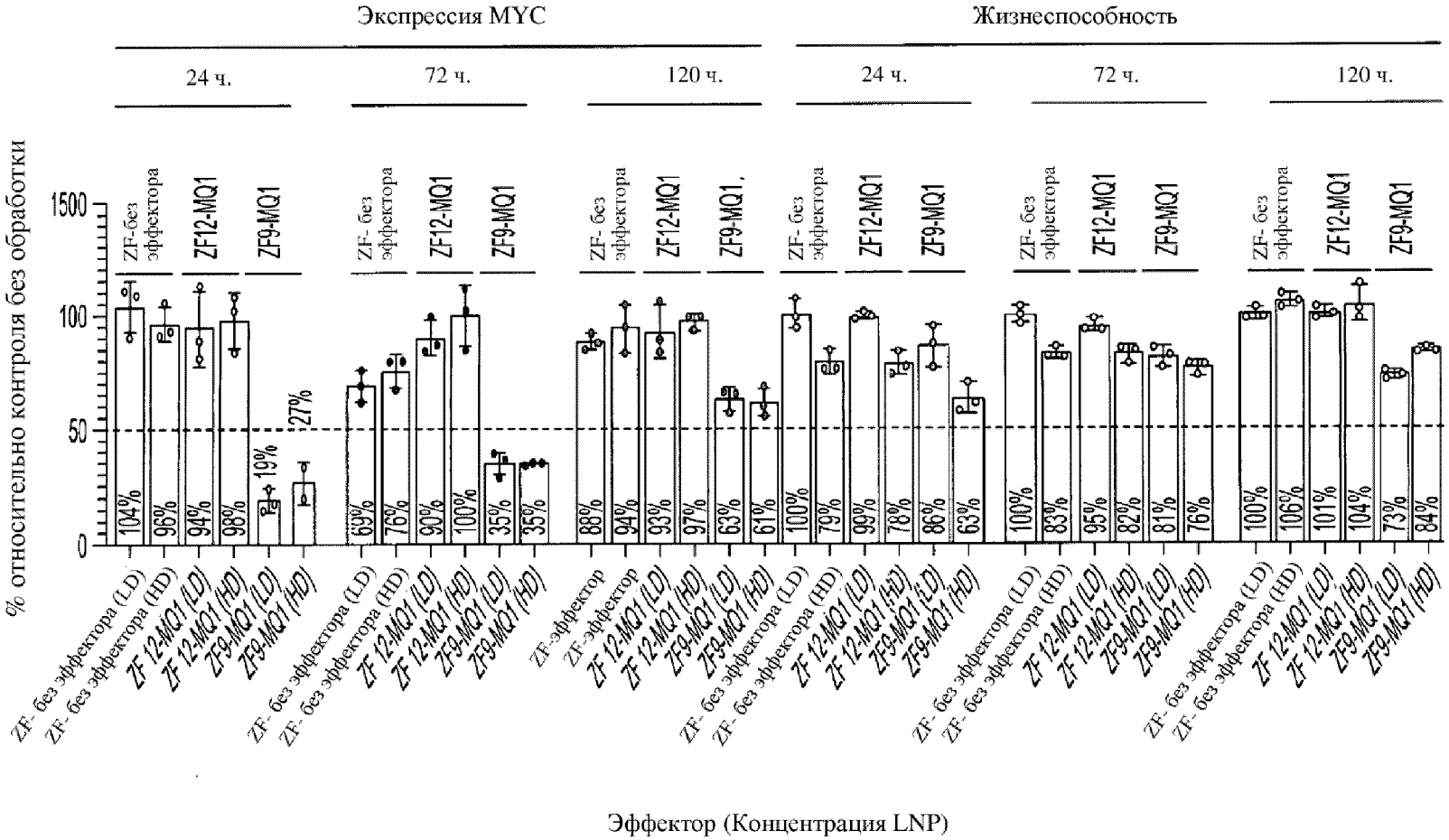

ФИГ. 6А,
продолжение


% относительно контроля без обработки
0
50
100
150
24 ч.
48 ч.
72 ч.
100%
100%
100%
Необработанные
117%
103%
108%
ZF6-без эффектора
53%
81%
96%
ZF7-MQ1
41%
46%
45%
ZF8-MQ1
ZF9-MQ1
120%
119%
110%
ZF10-MQ1
22%
44%
48%
ZF11-MQ1
44%
73%
92%
ZF12-MQ1

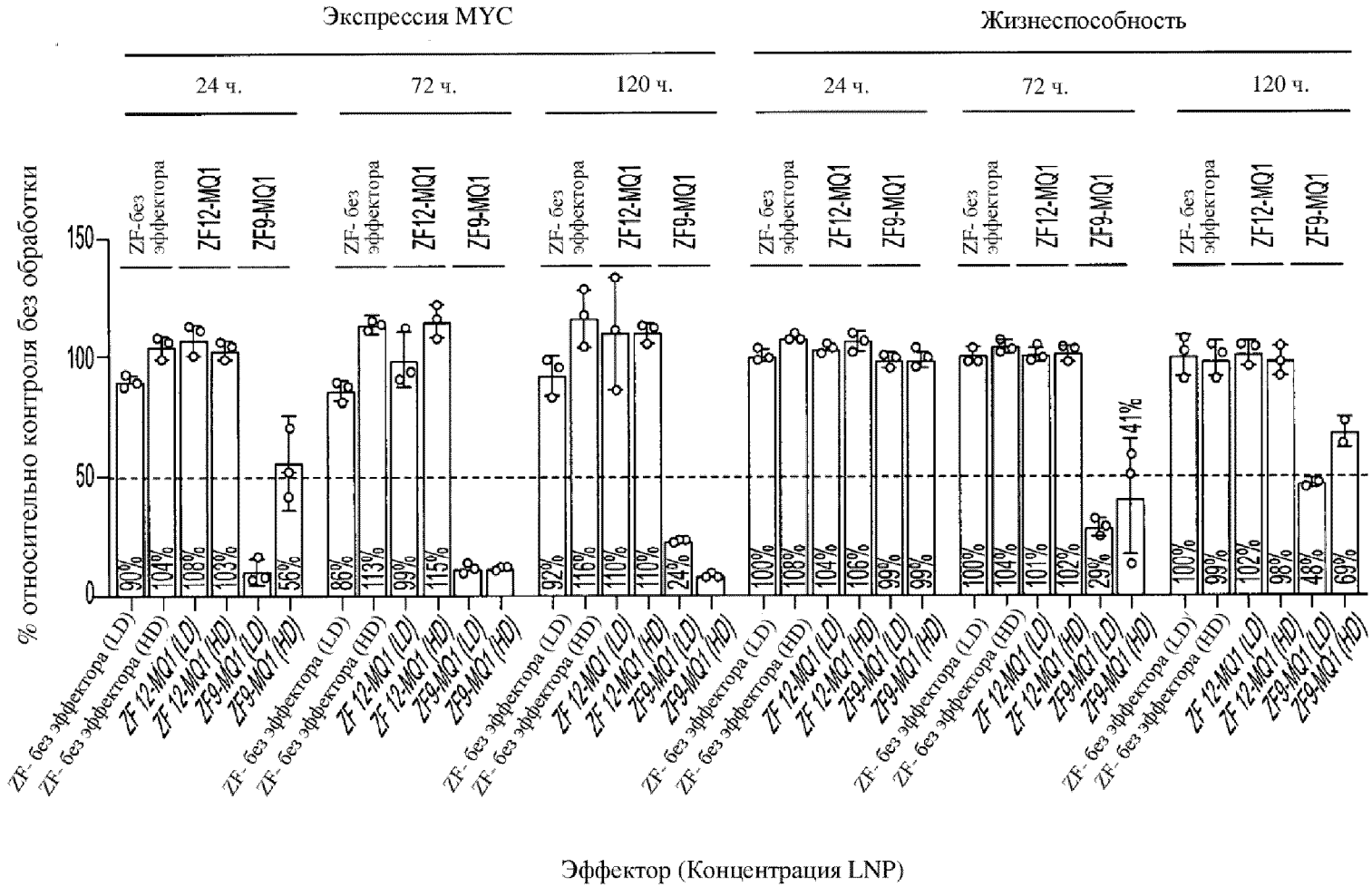
ФИГ. 6В


Экспрессия MYC
Жизнеспособность
24 ч.
72 ч.
120 ч.
24 ч.
72 ч.
120 ч.
% относительно контроля без обработки
200
150
100
50
0
ZF- без эффектора
ZF12-MQ1
ZF9-MQ1
93%
107%
100%
95%
24%
35%
93%
88%
98%
139%
86%
84%
78%
87%
100%
109%
107%
111%
96%
112%
93%
96%
84%
99%
100%
83%
107%
106%
26%
31%
ZF- без эффектора (LD)
ZF- без эффектора (HD)
ZF 12-MQ1 (LD)
ZF 12-MQ1 (HD)
ZF9-MQ1 (LD)
ZF9-MQ1 (HD)
Эффектор (Концентрация LNP)

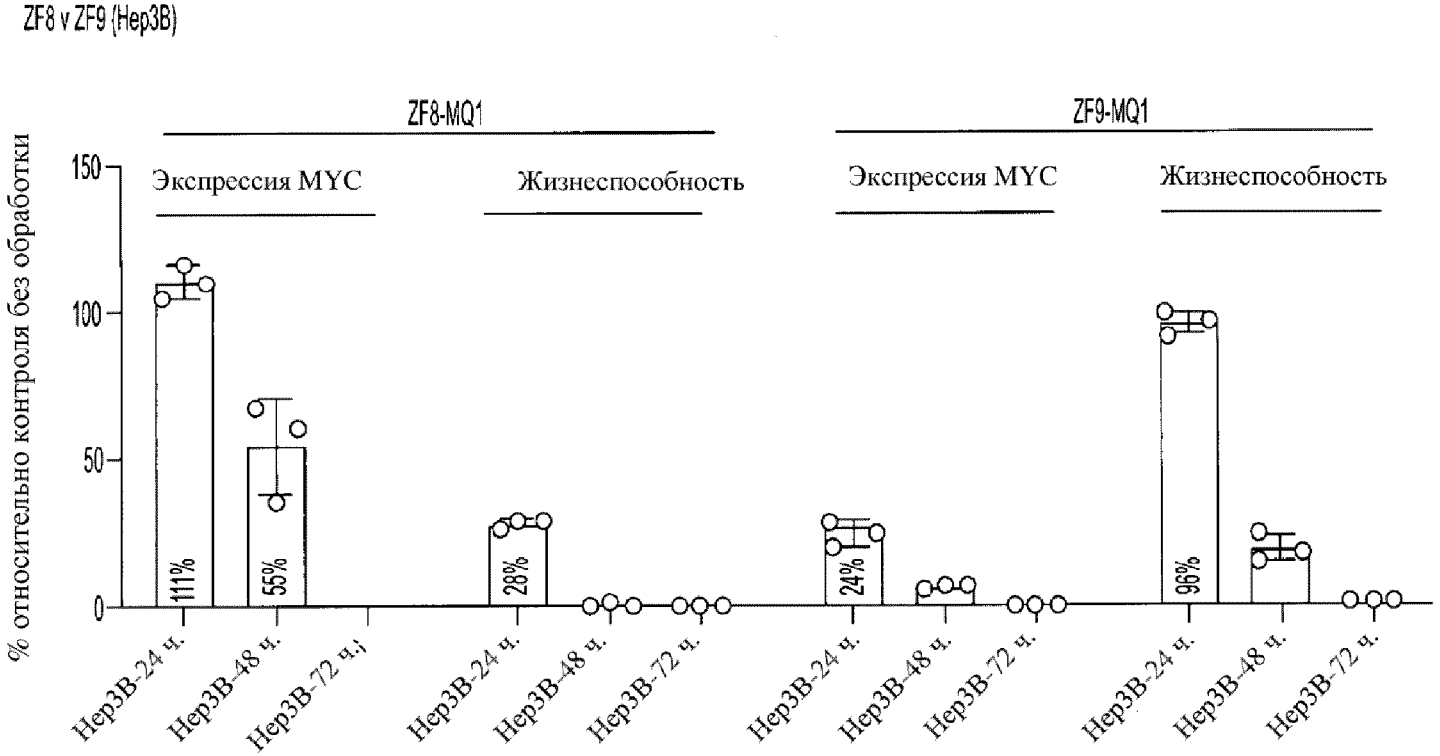
**ФИГ. 7А**


Экспрессия MYC
Жизнеспособность
24 ч.
72 ч.
120 ч.
% относительно контроля без обработки
1500
100
50
0
ZF-без эффектора
ZF12-MQ1
ZF9-MQ1
104%
96%
94%
98%
19%
27%
69%
76%
90%
100%
35%
35%
88%
94%
93%
97%
63%
61%
100%
79%
99%
78%
86%
63%
100%
83%
95%
82%
81%
76%
100%
106%
101%
104%
73%
84%
ZF- без эффектора (LD)
ZF- без эффектора (HD)
ZF 12-MQ1 (LD)
ZF 12-MQ1 (HD)
ZF9-MQ1 (LD)
ZF9-MQ1 (HD)
ZF- эффектор
Эффектор (Концентрация LNP)

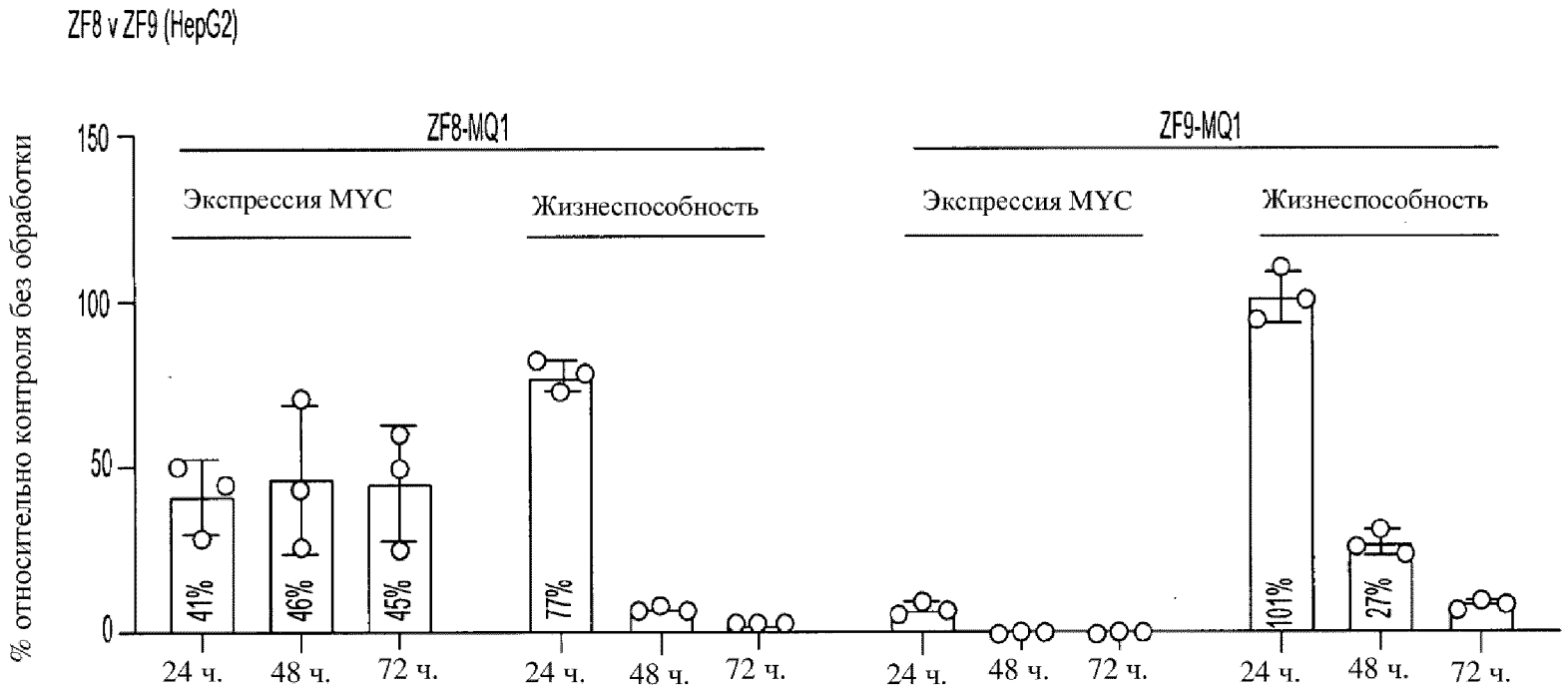
**ФИГ. 7В**


Экспрессия MYC
Жизнеспособность
24 ч.
72 ч.
120 ч.
ZF- без эффектора
ZF12-MQ1
ZF9-MQ1
% относительно контроля без обработки
150
100
50
0
90%
104%
108%
103%
56%
86%
113%
99%
115%
92%
116%
110%
110%
24%
100%
108%
104%
106%
99%
99%
100%
104%
101%
102%
29%
141%
100%
99%
102%
98%
48%
69%
ZF- без эффектора (LD)
ZF- без эффектора (HD)
ZF 12-MQ1 (LD)
ZF 12-MQ1 (HD)
ZF9-MQ1 (LD)
ZF9-MQ1 (HD)
Эффектор (Концентрация LNP)

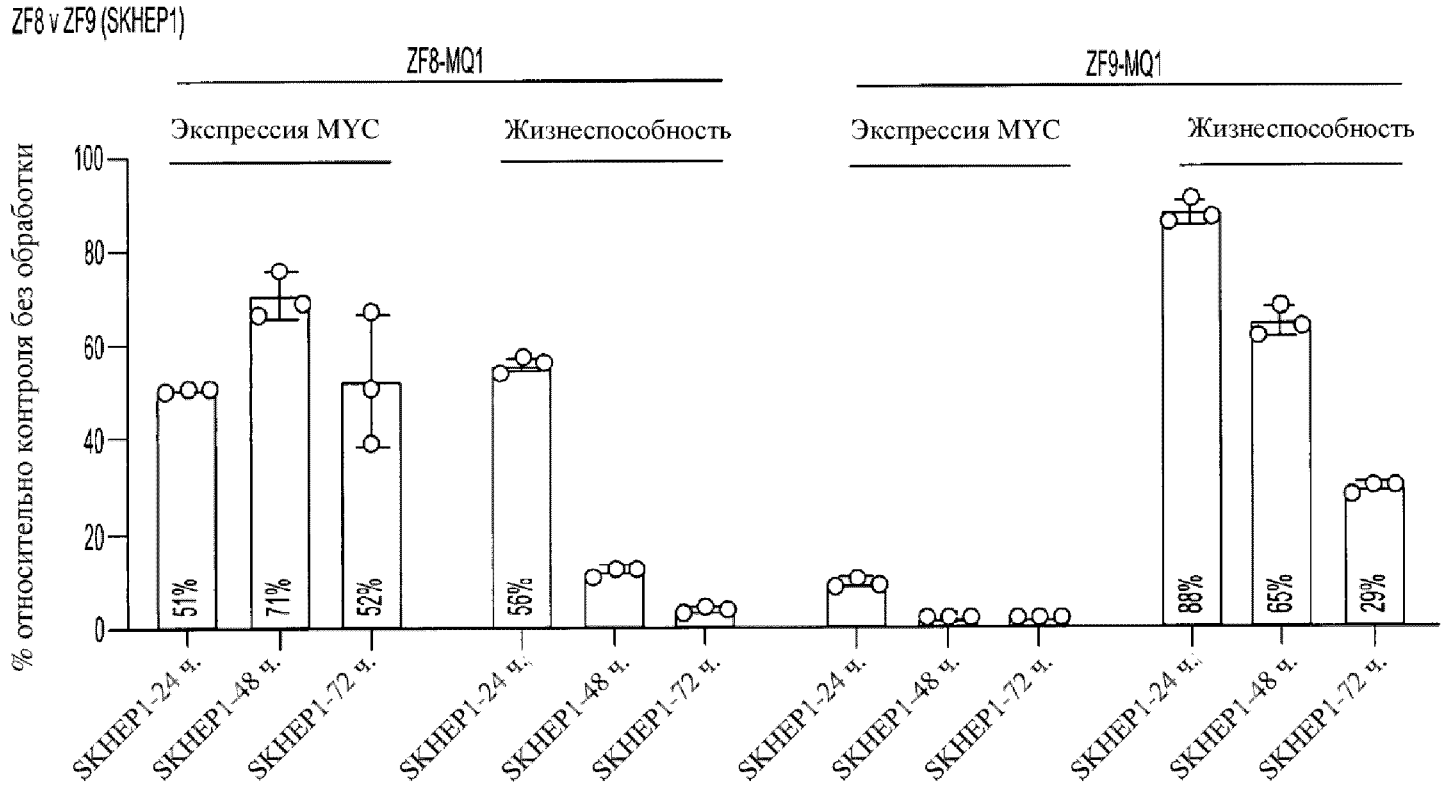
**ФИГ. 7C**


ZF8 v ZF9 (Hep3B)
ZF8-MQ1
ZF9-MQ1
Экспрессия MYC
Жизнеспособность
Экспрессия MYC
Жизнеспособность
% относительно контроля без обработки
150
100
50
0
111%
55%
28%
24%
96%
Hep3B-24 ч.
Hep3B-48 ч.
Hep3B-72 ч.
Hep3B-24 ч.
Hep3B-48 ч.
Hep3B-72 ч.
Hep3B-24 ч.
Hep3B-48 ч.
Hep3B-72 ч.
Hep3B-24 ч.
Hep3B-48 ч.
Hep3B-72 ч.

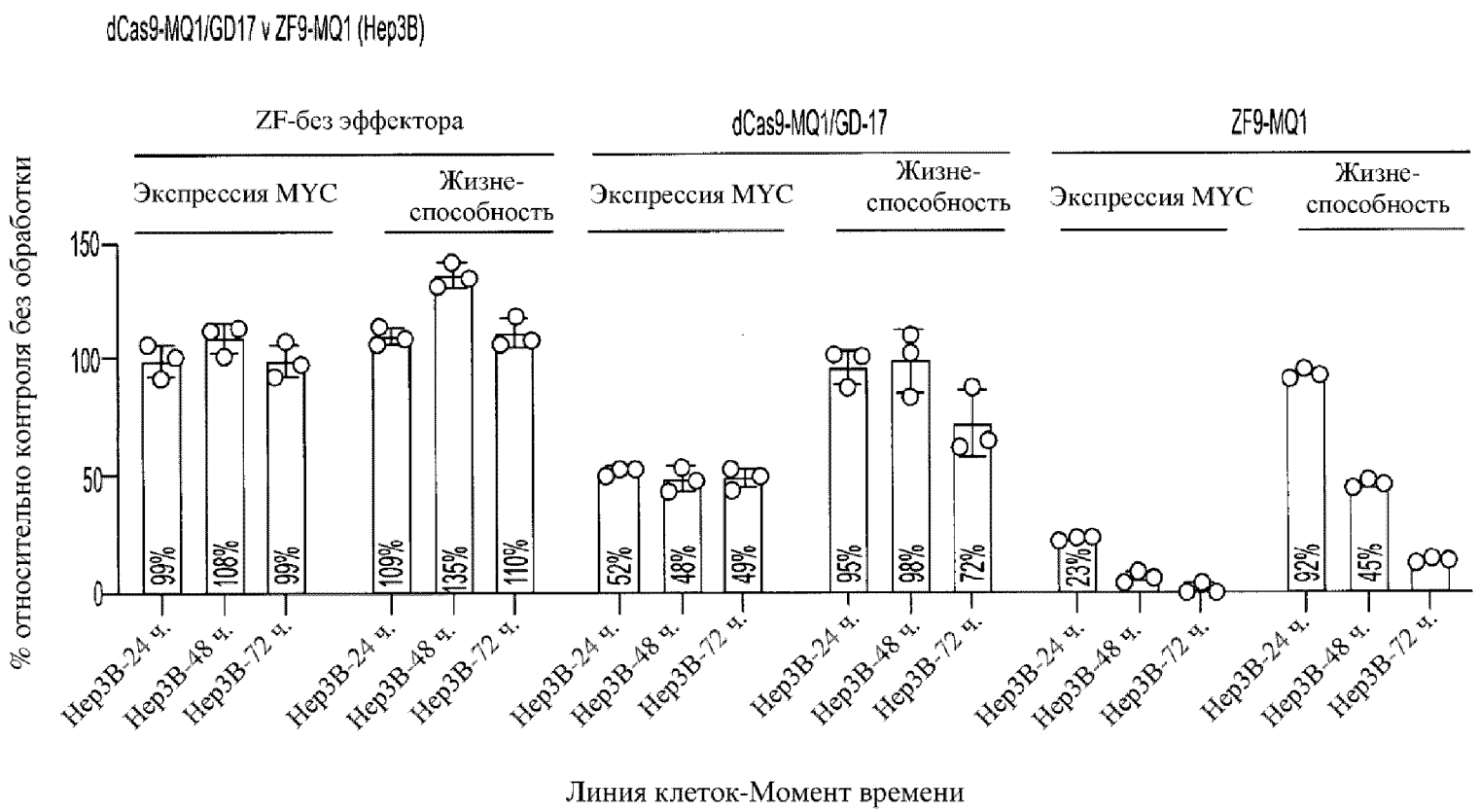
**ФИГ. 7D**


ZF8 v ZF9 (HepG2)
% относительно контроля без обработки
150
100
50
0
ZF8-MQ1
ZF9-MQ1
Экспрессия MYC
Жизнеспособность
Экспрессия MYC
Жизнеспособность
41%
46%
45%
77%
101%
27%
24 ч.
48 ч.
72 ч.
24 ч.
48 ч.
72 ч.
24 ч.
48 ч.
72 ч.
24 ч.
48 ч.
72 ч.

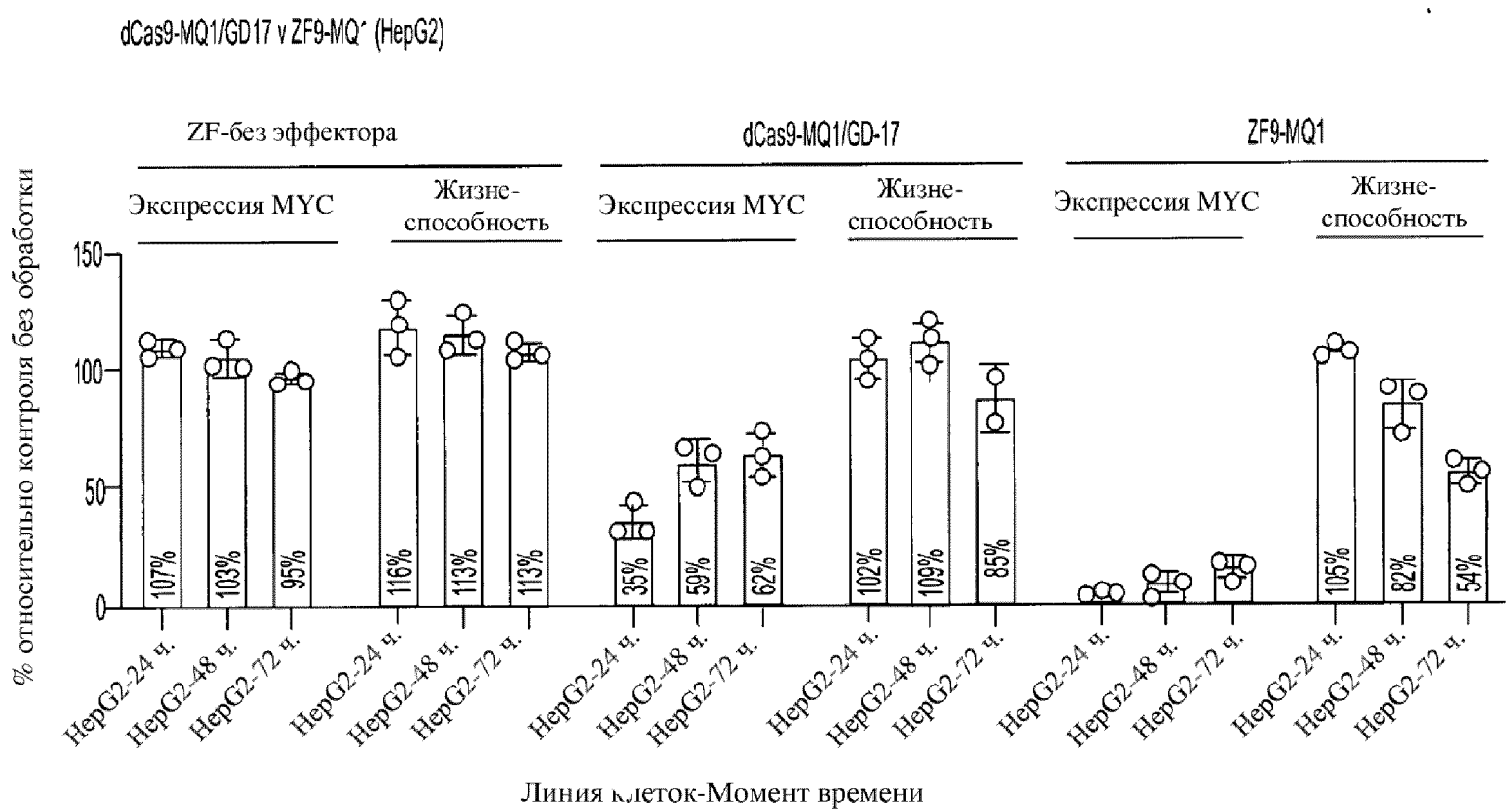
**ФИГ. 7E**


ZF8 v ZF9 (SKHEP1)
ZF8-MQ1
ZF9-MQ1
Экспрессия MYC
Жизнеспособность
Экспрессия MYC
Жизнеспособность
% относительно контроля без обработки
100
80
60
40
20
0
51%
71%
52%
56%
88%
65%
29%
SKHEP1-24 ч.
SKHEP1-48 ч.
SKHEP1-72 ч.
SKHEP1-24 ч.
SKHEP1-48 ч.
SKHEP1-72 ч.
SKHEP1-24 ч.
SKHEP1-48 ч.
SKHEP1-72 ч.
SKHEP1-24 ч.
SKHEP1-48 ч.
SKHEP1-72 ч.

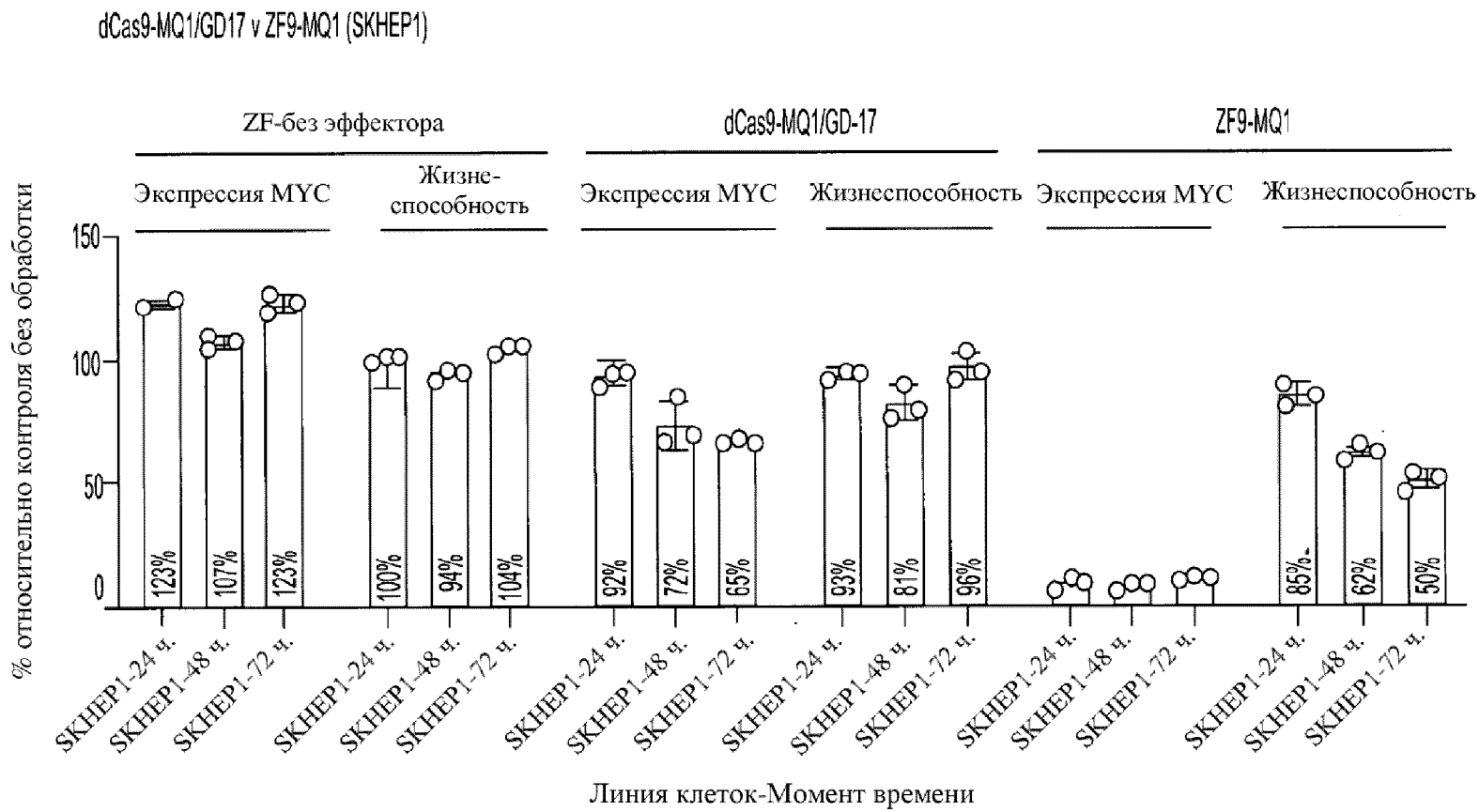
**ФИГ. 7F**


dCas9-MQ1/GD17 v ZF9-MQ1 (Hep3B)
ZF-без эффектора
dCas9-MQ1/GD-17
ZF9-MQ1
Экспрессия MYC
Жизне-способность
Экспрессия MYC
Жизне-способность
Экспрессия MYC
Жизне-способность
% относительно контроля без обработки
150
100
50
0
99%
108%
99%
109%
135%
110%
52%
48%
49%
95%
98%
72%
23%
92%
45%
Hep3B-24 ч.
Hep3B-48 ч.
Hep3B-72 ч.
Линия клеток-Момент времени

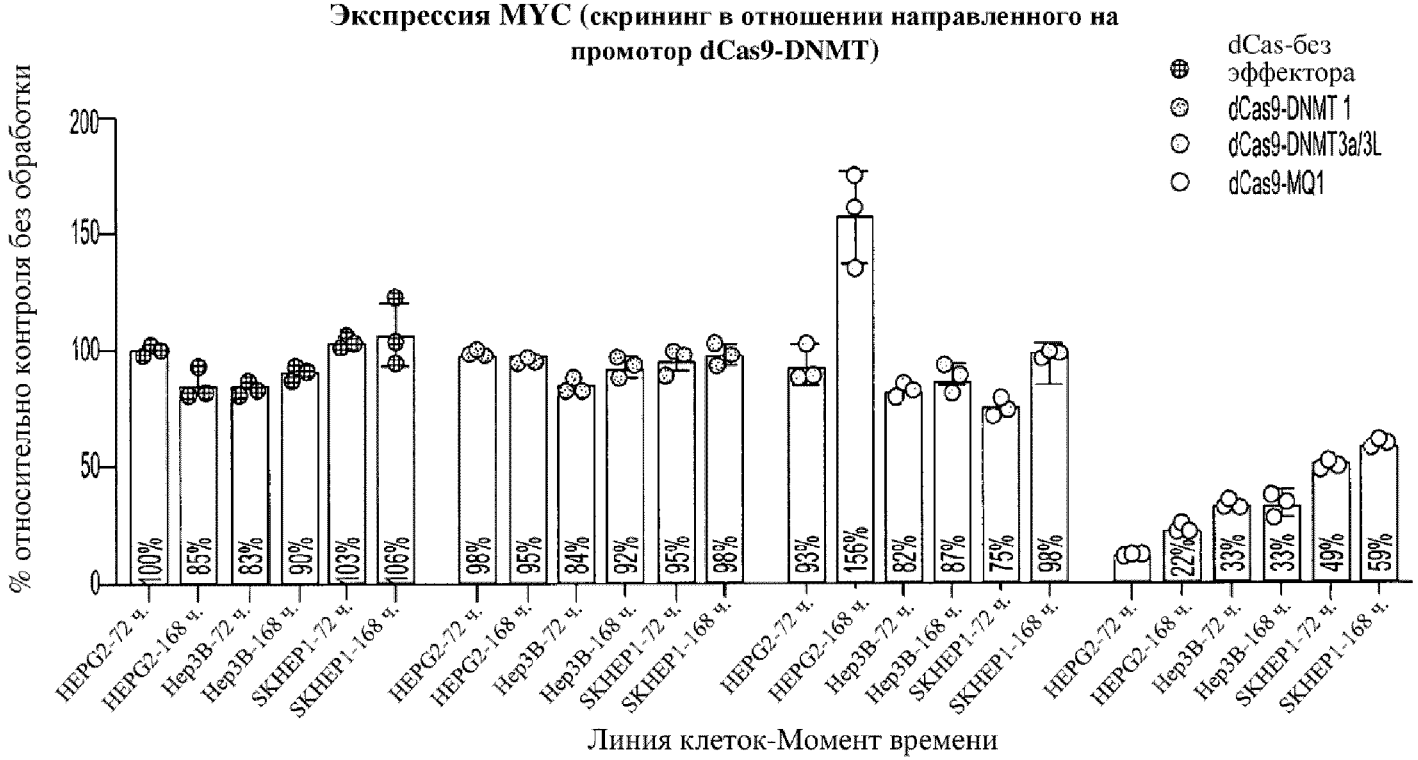
**ФИГ. 7G**


dCas9-MQ1/GD17 v ZF9-MQ' (HepG2)
ZF-без эффектора
dCas9-MQ1/GD-17
ZF9-MQ1
Экспрессия MYC
Жизне-способность
Экспрессия MYC
Жизне-способность
Экспрессия MYC
Жизне-способность
% относительно контроля без обработки
150
100
50
0
107%
103%
95%
116%
113%
113%
35%
59%
62%
102%
109%
85%
105%
82%
54%
HepG2-24 ч.
HepG2-48 ч.
HepG2-72 ч.
Линия клеток-Момент времени

**ФИГ. 7H**


dCas9-MQ1/GD17 v ZF9-MQ1 (SKHEP1)
ZF-без эффектора
dCas9-MQ1/GD-17
ZF9-MQ1
Экспрессия MYC
Жизне-способность
Экспрессия MYC
Жизнеспособность
Экспрессия MYC
Жизнеспособность
% относительно контроля без обработки
150
100
50
0
123%
107%
123%
100%
94%
104%
92%
72%
65%
93%
81%
96%
85%
62%
50%
SKHEP1-24 ч.
SKHEP1-48 ч.
SKHEP1-72 ч.
Линия клеток-Момент времени

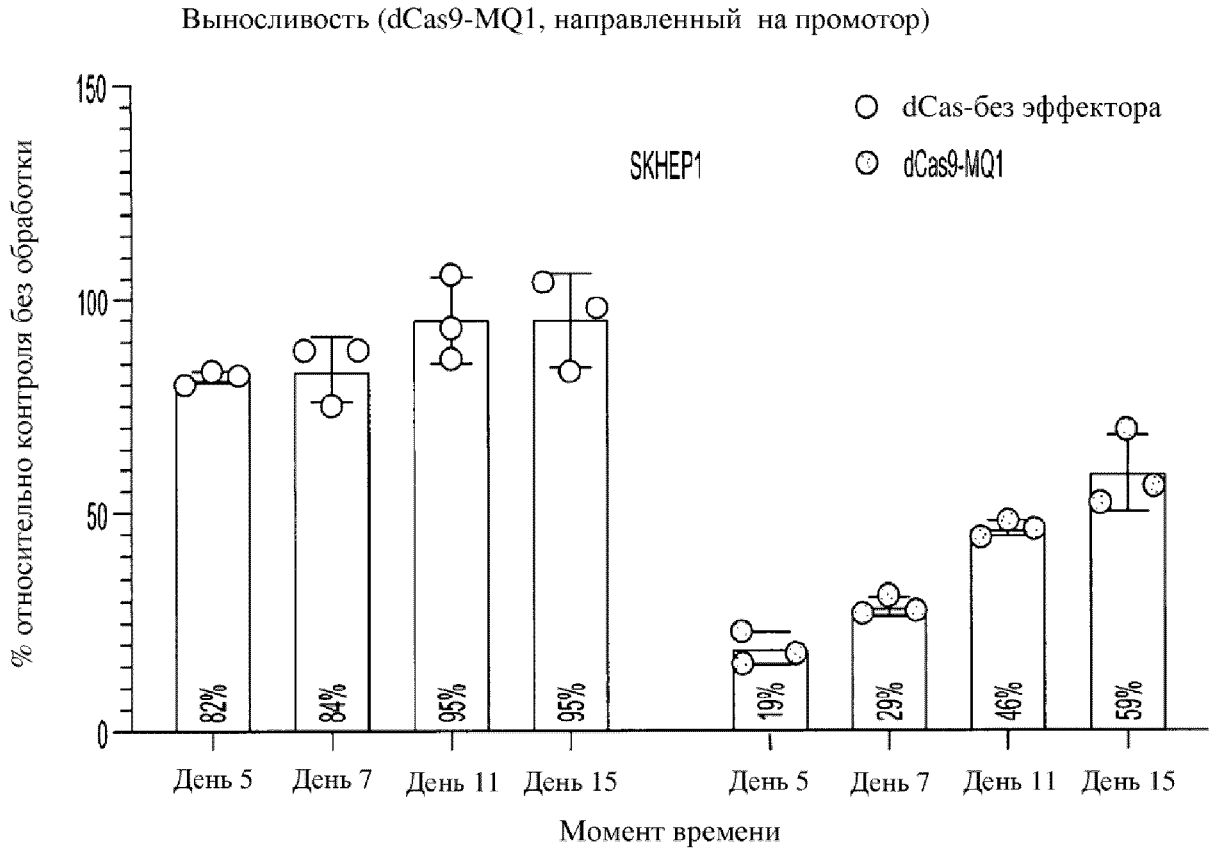
**ФИГ. 7I**


Экспрессия MYC (скрининг в отношении направленного на промотор dCas9-DNMT)
dCas-без эффектора
dCas9-DNMT 1
dCas9-DNMT3a/3L
dCas9-MQ1
% относительно контроля без обработки
200
150
100
50
0
100%
85%
83%
90%
103%
106%
98%
95%
84%
92%
95%
98%
93%
156%
82%
87%
75%
98%
22%
33%
33%
49%
59%
HEPG2-72 ч.
HEPG2-168 ч.
Hep3B-72 ч.
Hep3B-168 ч.
SKHEP1-72 ч.
SKHEP1-168 ч.
Линия клеток-Момент времени

**ФИГ. 8A**

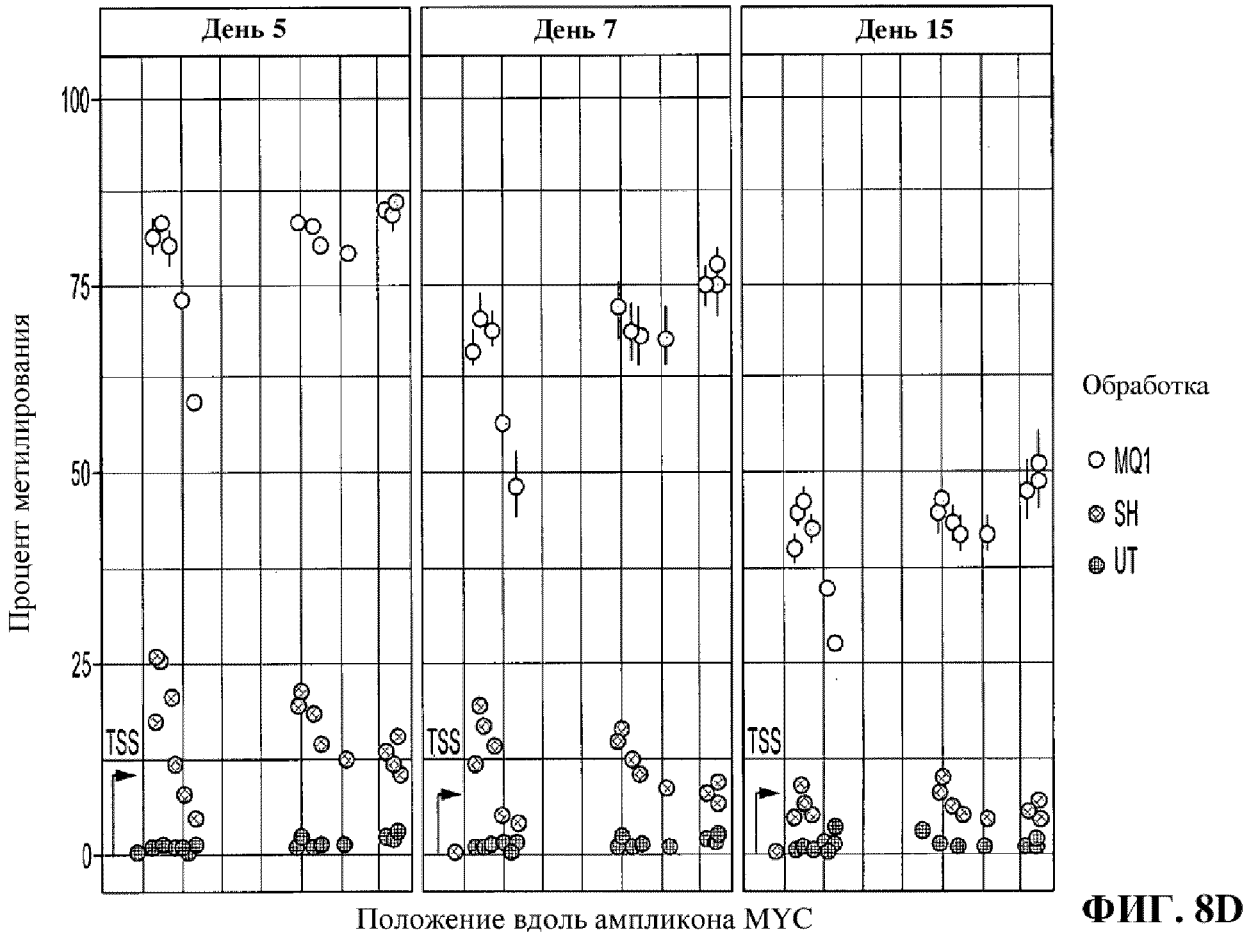

Жизнеспособность (скрининг в отношении направленного на промотор dCas9-DNMT)
dCas-без эффектора
dCas9-DNMT1
dCas9-DNMT3a/3L
dCas9-MQ1
% относительно контроля без обработки
150
100
50
0
80%
108%
86%
77%
90%
96%
80%
107%
91%
80%
85%
74%
68%
94%
81%
46%
92%
98%
33%
85%
93%
HepG2-72 ч.
HepG2-168 ч.
Hep3B-72 ч.
Hep3B-168 ч.
SKHEP1-72 ч.
SKHEP1-168 ч.
HEPG2-72 ч.
HepG2-168 ч.
Hep3B-72 ч.
Hep3B-168 ч.
SKHEP1-72 ч.
SKHEP1-168 ч.
HEPG2-72 ч.
HepG2-168 ч.
Hep3B-72 ч.
Hep3B-168 ч.
SKHEP1-72 ч.
SKHEP1-168 ч.
HEPG2-72 ч.
HepG2-168 ч.
Hep3B-72 ч.
Hep3B-168 ч.
SKHEP1-72 ч.
SKHEP1-168 ч.
Линия клеток-Момент времени

**ФИГ. 8B**

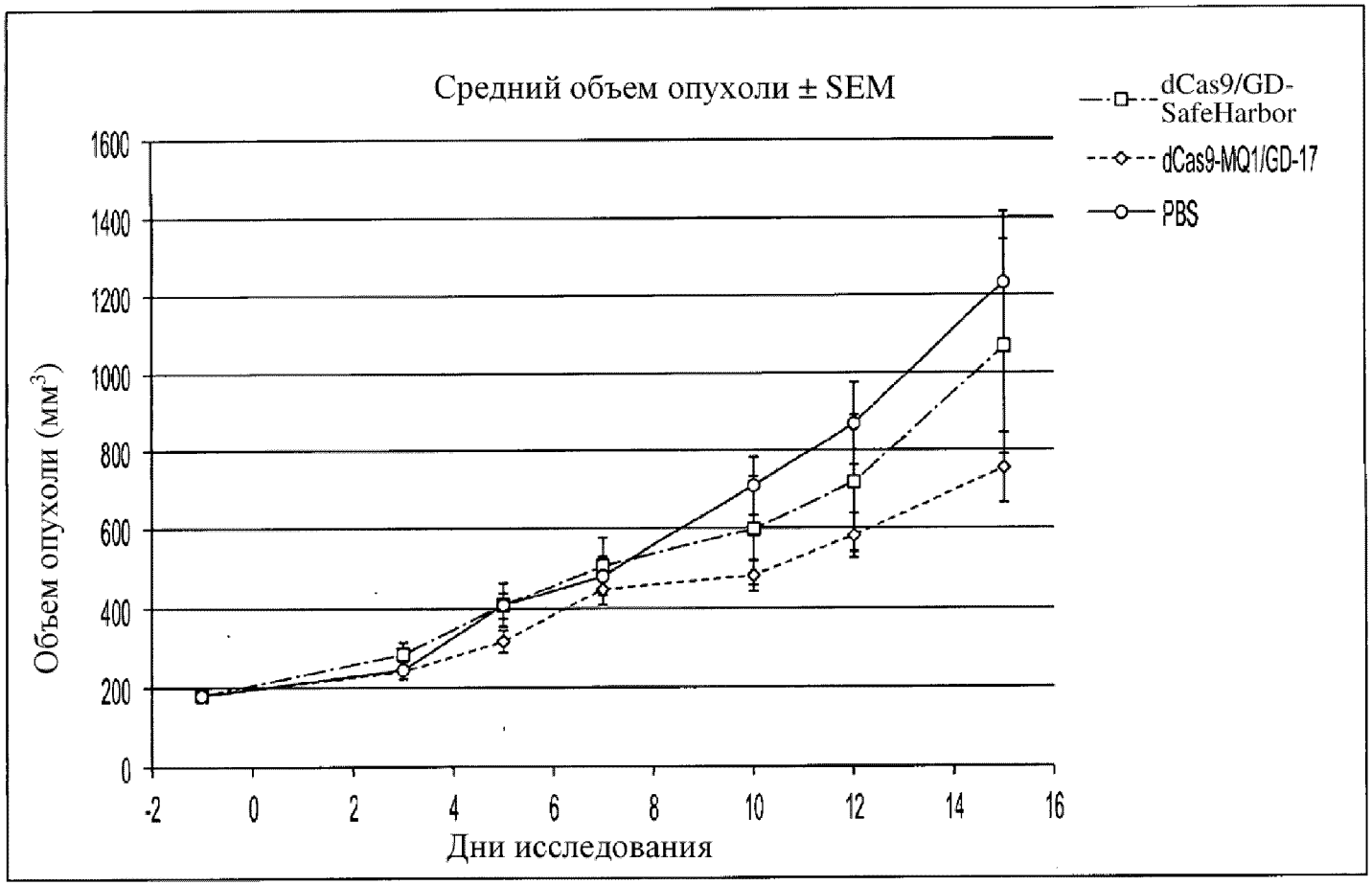

Выносливость (dCas9-MQ1, направленный на промотор)
% относительно контроля без обработки
150
100
50
0
dCas-без эффектора
dCas9-MQ1
SKHEP1
82%
84%
95%
95%
19%
29%
46%
59%
День 5
День 7
День 11
День 15
День 5
День 7
День 11
День 15
Момент времени

**ФИГ. 8C**

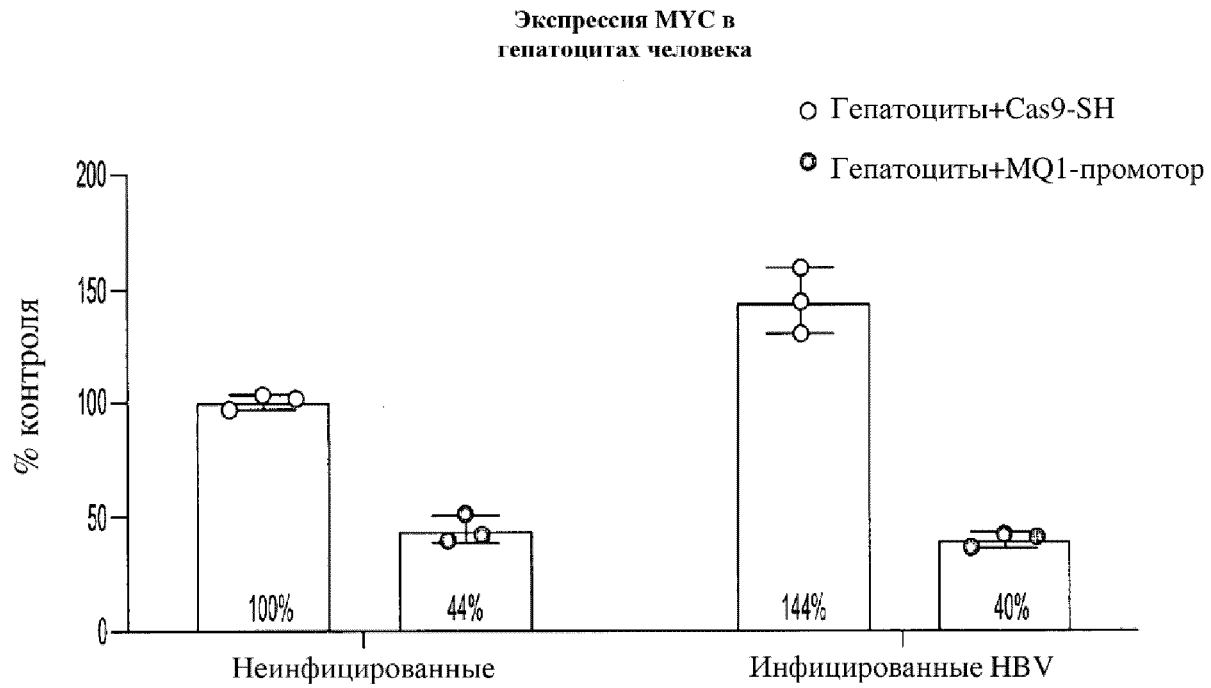
**Процент метилирования после нацеленной обработки в локусе MYC**



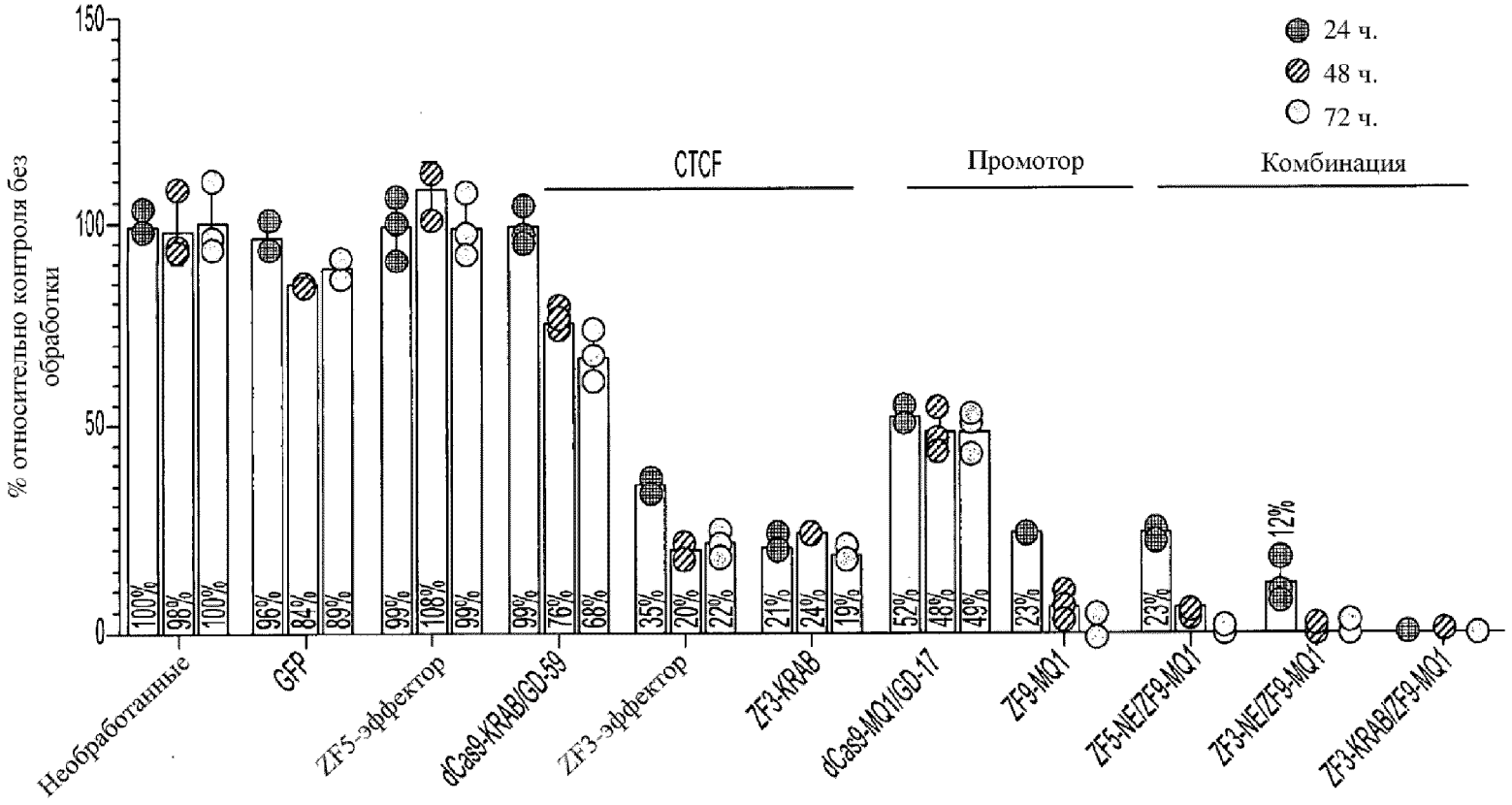

**ФИГ. 8D**


Средний объем опухоли ± SEM
dCas9/GD-SafeHarbor
dCas9-MQ1/GD-17
PBS
Объем опухоли (мм3)
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
-2
0
2
4
6
8
10
12
14
16
Дни исследования

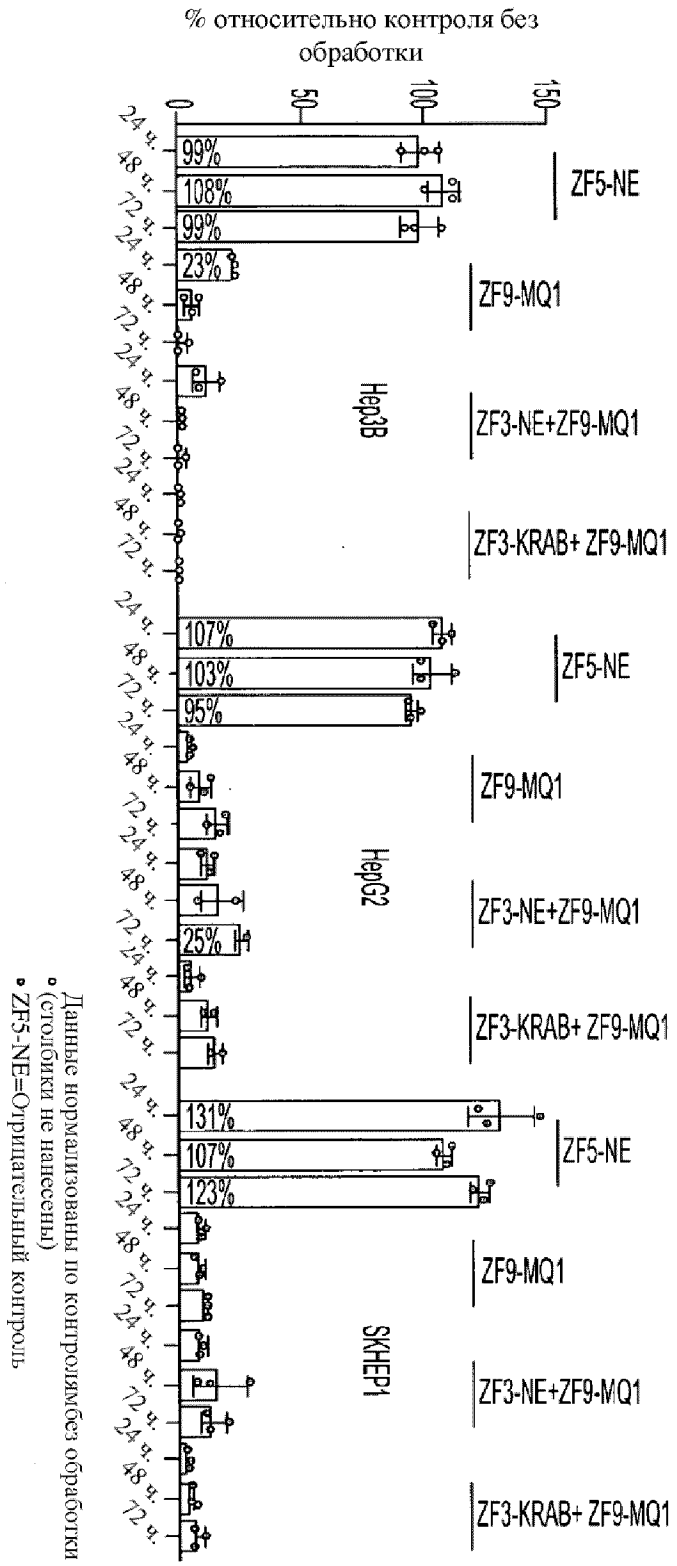
ФИГ. 9


Экспрессия MYC в
гепатоцитах человека
Гепатоциты+Cas9-SH
Гепатоциты+MQ1-промотор
% контроля
200
150
100
50
0
100%
44%
144%
40%
Неинфицированные
Инфицированные HBV

ФИГ. 10


% относительно контроля без обработки
150
100
50
0
24 ч.
48 ч.
72 ч.
CTCF
Промотор
Комбинация
100%
98%
100%
96%
84%
89%
99%
108%
99%
99%
76%
68%
35%
20%
22%
21%
24%
19%
52%
48%
49%
23%
23%
12%
Необработанные
GFP
ZF5-эффектор
dCas9-KRAB/GD-59
ZF3-эффектор
ZF3-KRAB
dCas9-MQ1/GD-17
ZF9-MQ1
ZF5-NE/ZF9-MQ1
ZF3-NE/ZF9-MQ1
ZF3-KRAB/ZF9-MQ1

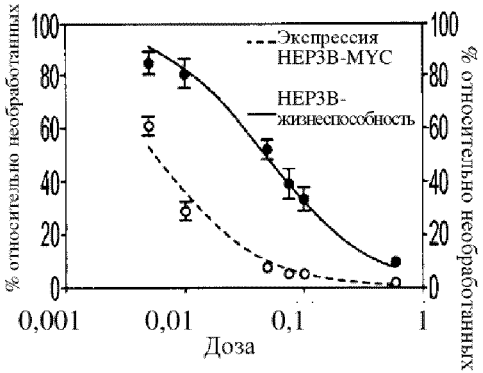
ФИГ. 11


% относительно контроля без обработки
0
50
100
150
24 ч.
48 ч.
72 ч.
99%
108%
99%
23%
ZF5-NE
ZF9-MQ1
ZF3-NE+ZF9-MQ1
ZF3-KRAB+ ZF9-MQ1
Hep3B
107%
103%
95%
25%
HepG2
131%
107%
123%
SKHEP1
Данные нормализованы по контролямбез обработки
(столбики не нанесены)
ZF5-NE=Отрицательный контроль

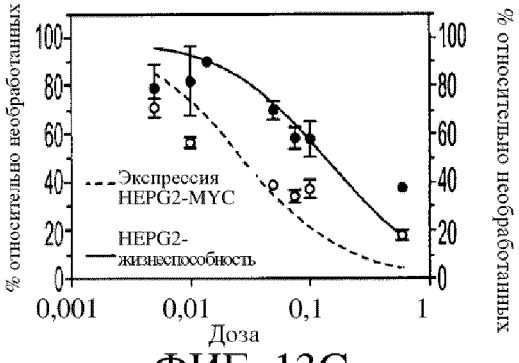
ФИГ. 12

| Линия клеток | Жизнеспособность ($EC_{50}$; мкг/мл) | mRNA MYC ($EC_{50}$; мкг/мл) |
|---|---|---|
| **Hep 3B** | 0,049 | 0,0057 |
| **Hep G2** | 0,13 | 0,028 |
| **SKHEP1** | 0,29 | 0,022 |
| **SNU-182** | 0,072 | 0,014 |
| **SNU-449** | 0,22 | 0,065 |

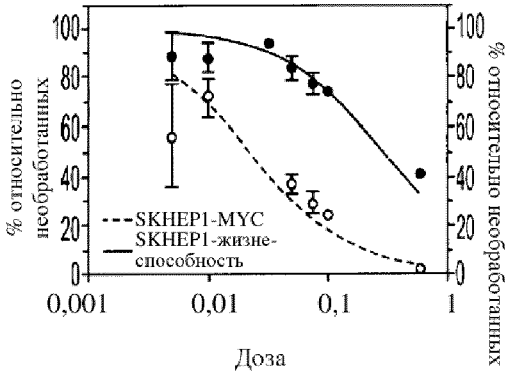
ФИГ. 13A



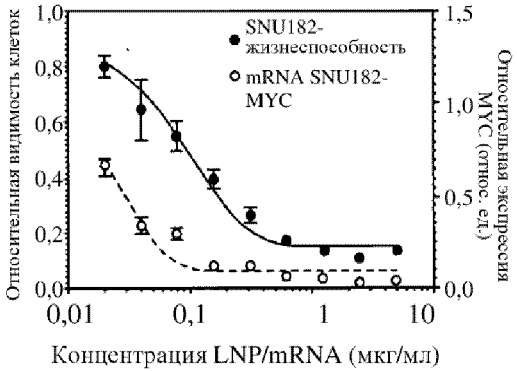

ФИГ. 13B



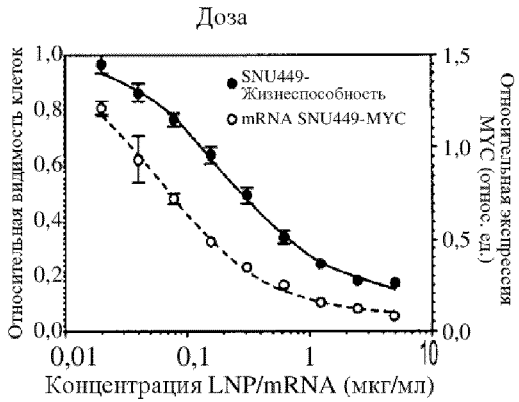

ФИГ. 13C




ФИГ. 13D

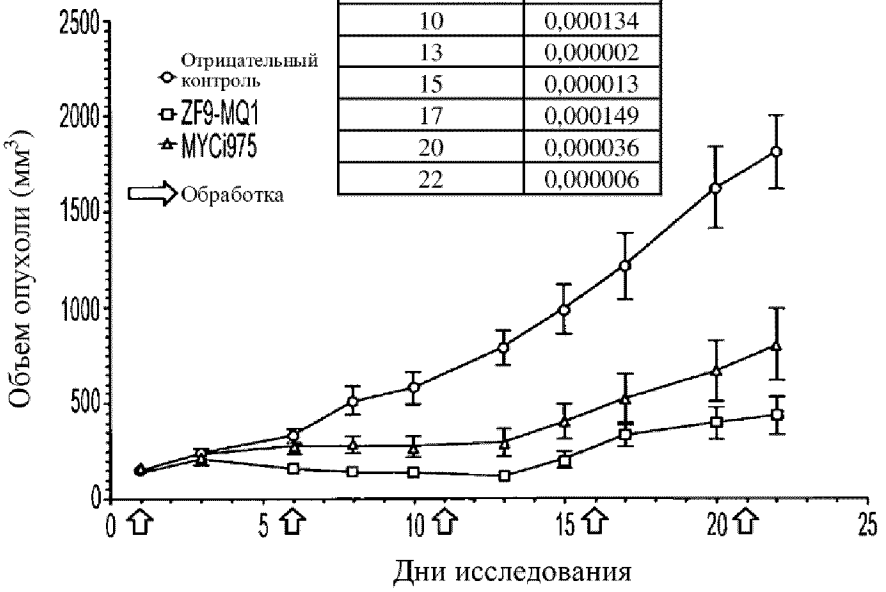



ФИГ. 13E

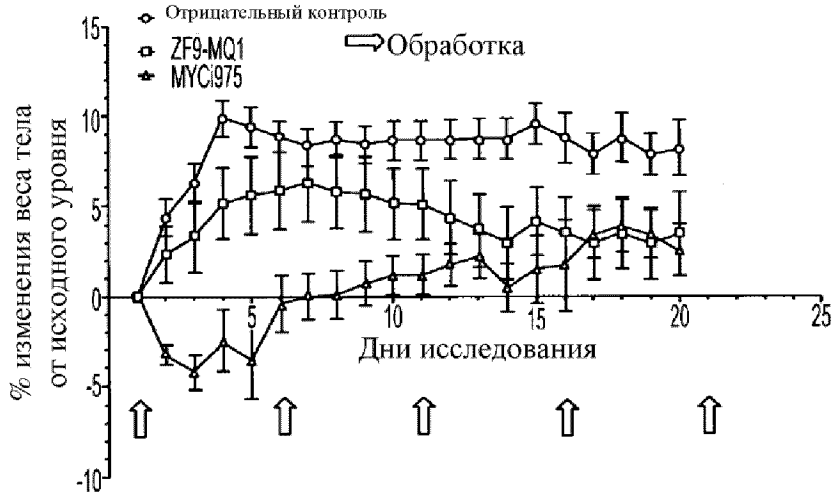



ФИГ. 13F

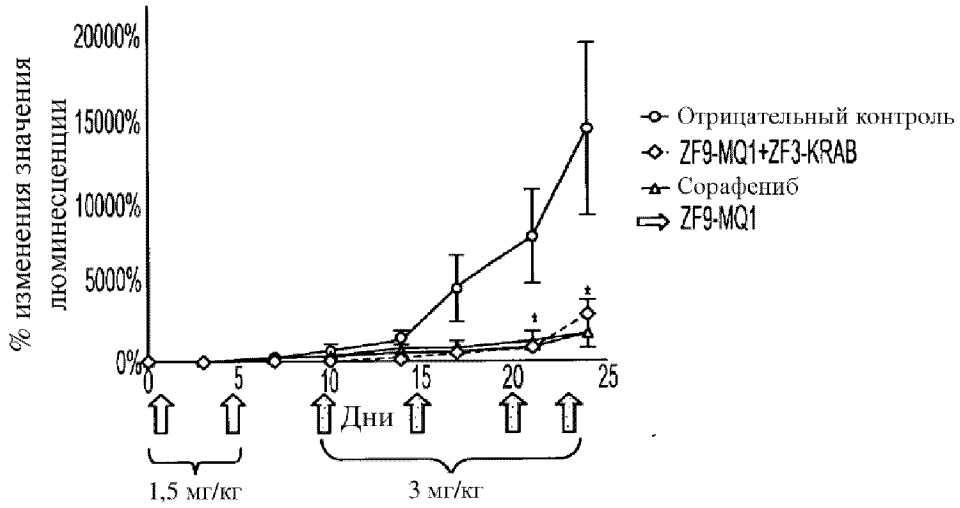
| Дни в исследовании | P-значение (t-тест) |
|---|---|
| 1 | 0,629310 |
| 3 | 0,525216 |
| 6 | 0,000979 |
| 8 | 0,000216 |
| 10 | 0,000134 |
| 13 | 0,000002 |
| 15 | 0,000013 |
| 17 | 0,000149 |
| 20 | 0,000036 |
| 22 | 0,000006 |



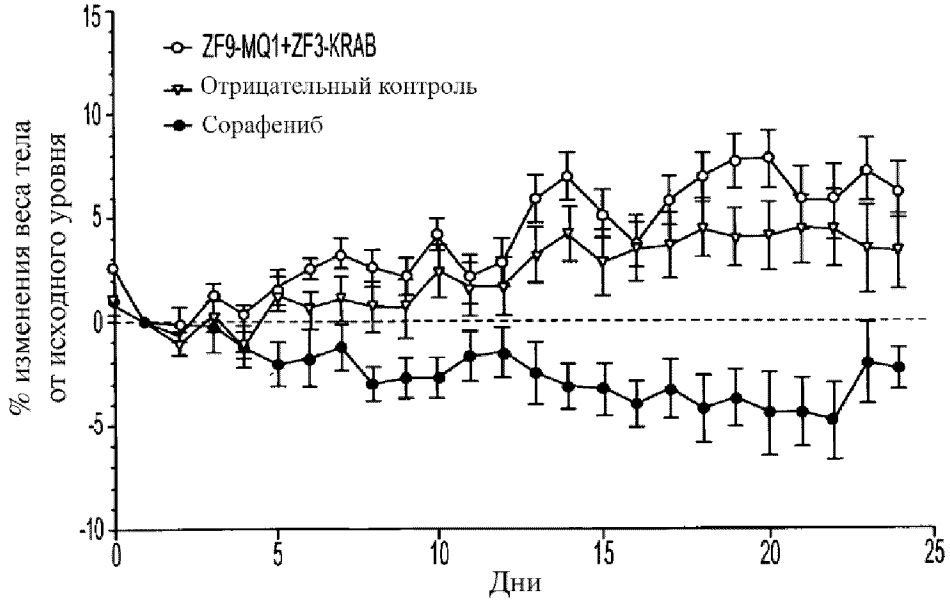

ФИГ. 14A



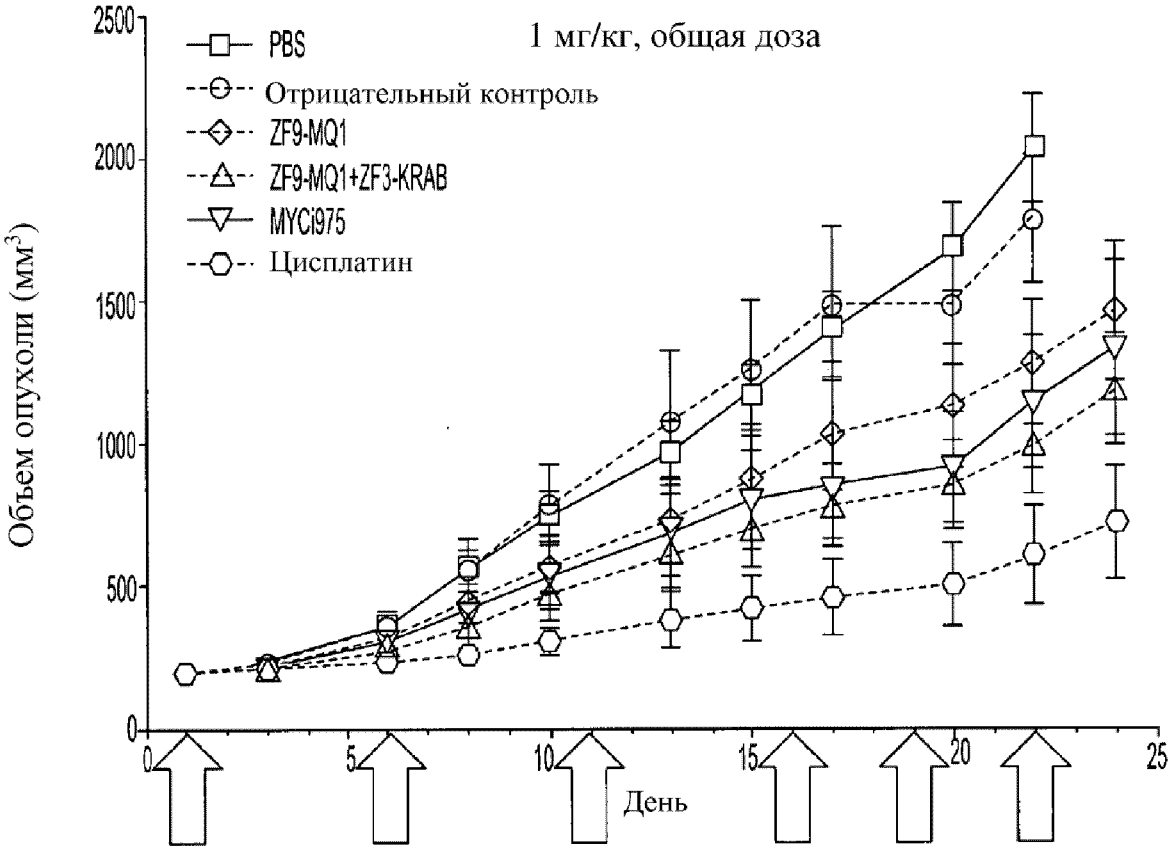

ФИГ. 14B



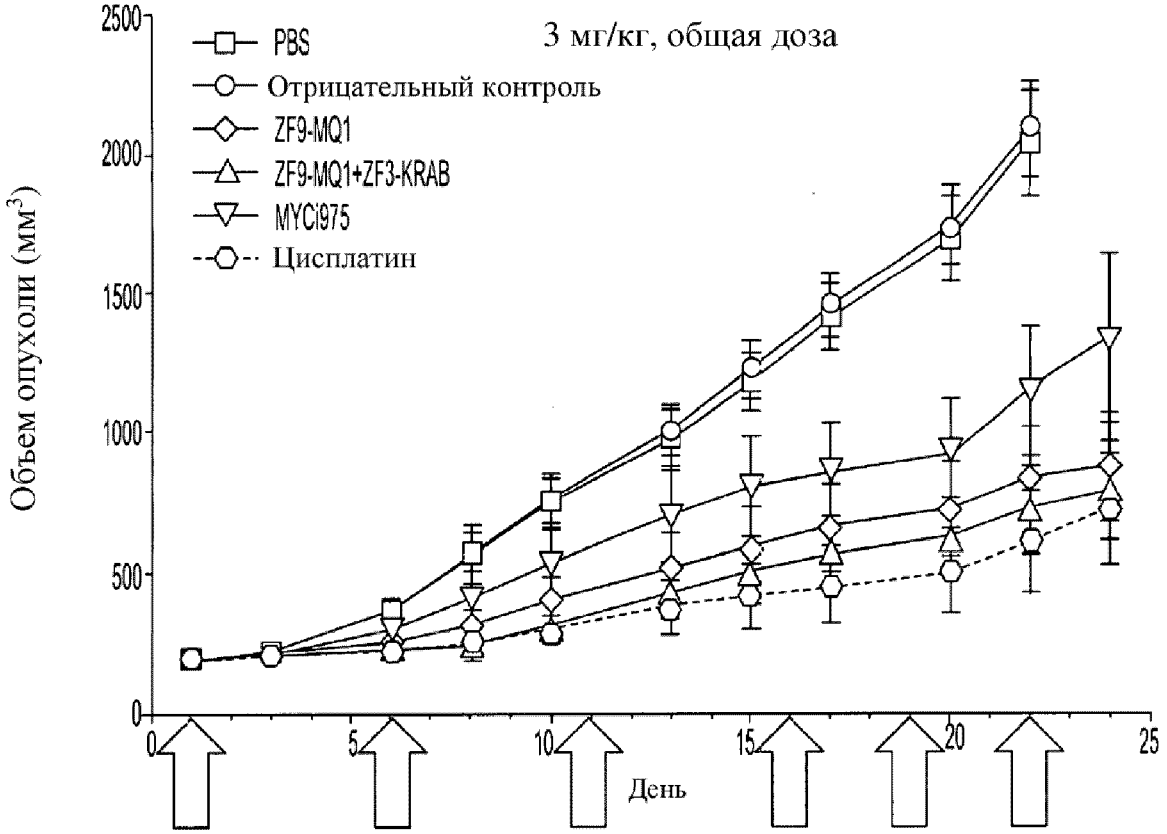

ФИГ. 15А



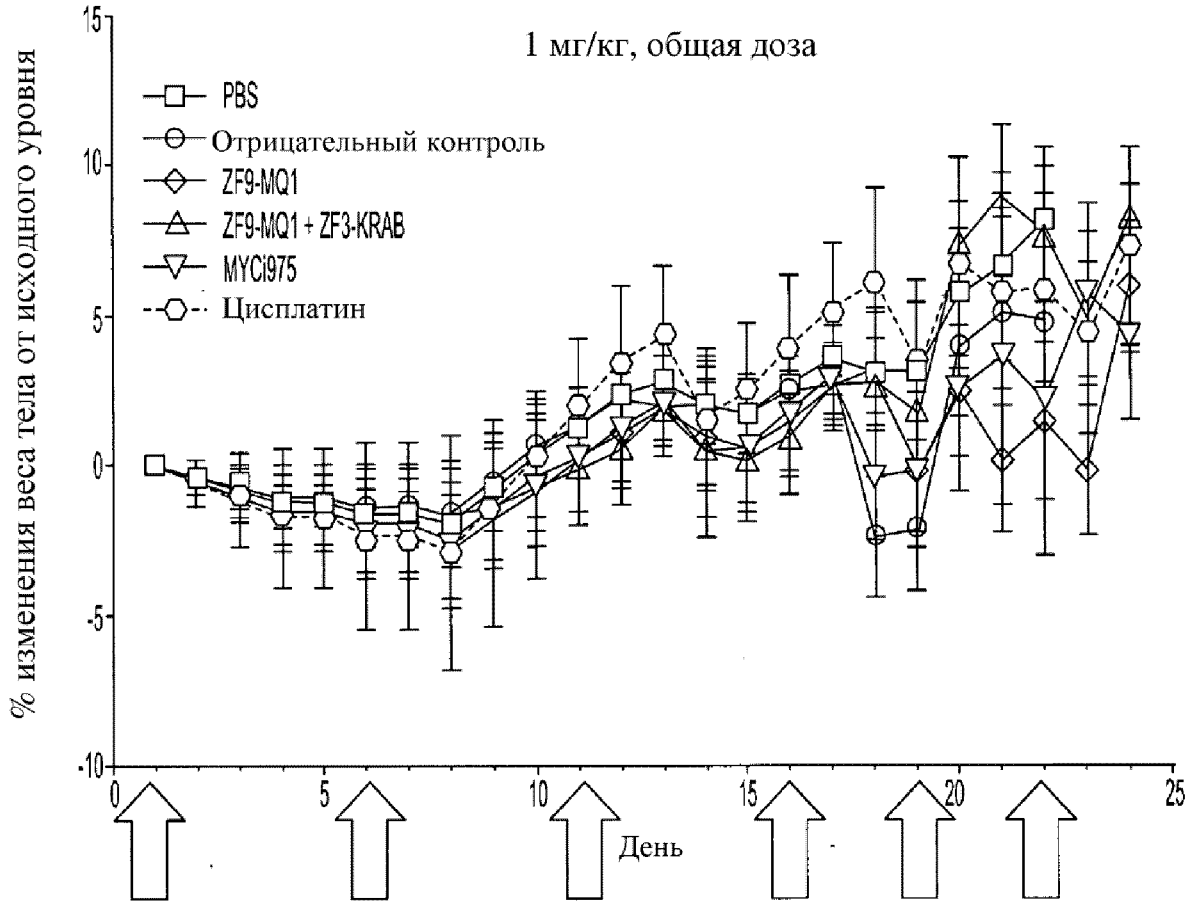

ФИГ. 15В


1 мг/кг, общая доза
PBS
Отрицательный контроль
ZF9-MQ1
ZF9-MQ1+ZF3-KRAB
MYCI975
Цисплатин
Объем опухоли (мм3)
2500
2000
1500
1000
500
0
0
5
10
15
20
25
День

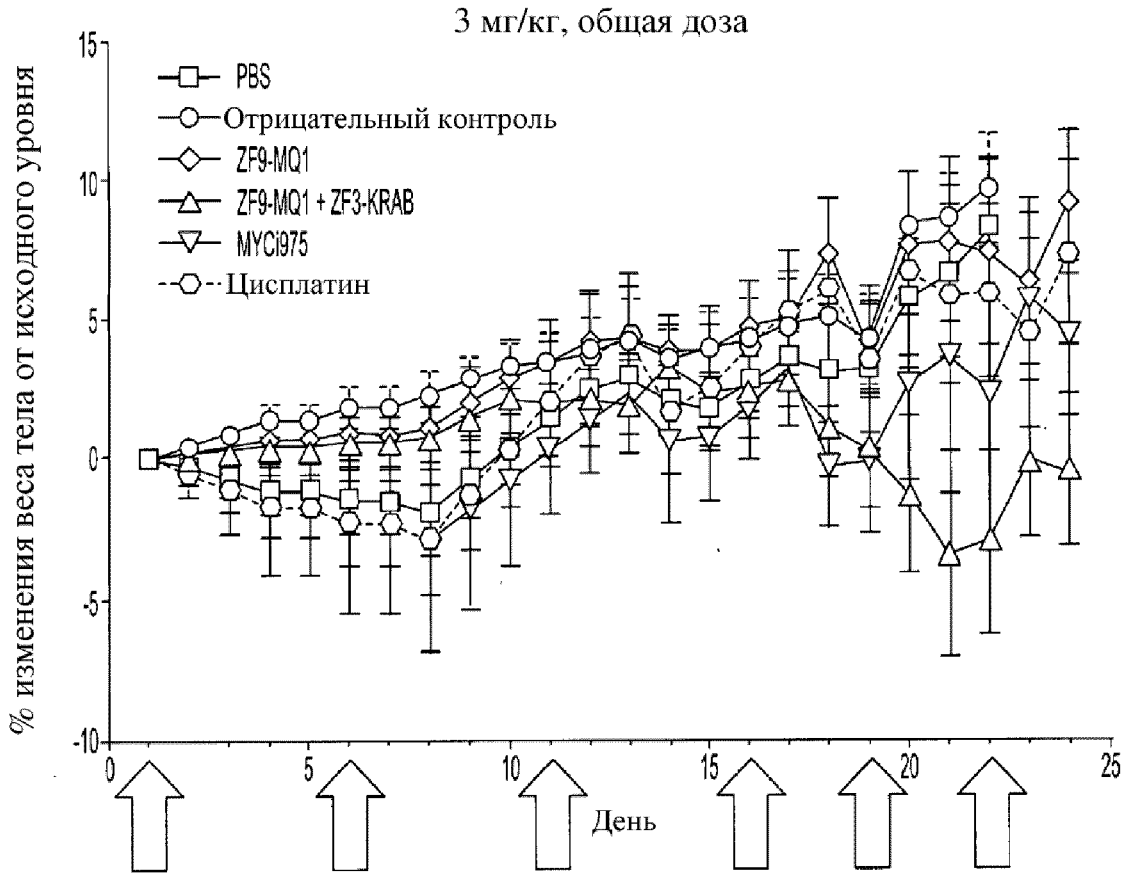
ФИГ. 16А


3 мг/кг, общая доза
PBS
Отрицательный контроль
ZF9-MQ1
ZF9-MQ1+ZF3-KRAB
MYCi975
Цисплатин
Объем опухоли (мм3)
2500
2000
1500
1000
500
0
0
5
10
15
20
25
День

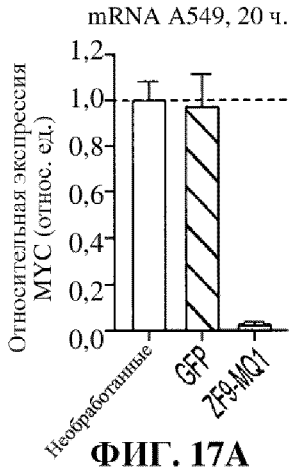
ФИГ. 16B


1 мг/кг, общая доза
PBS
Отрицательный контроль
ZF9-MQ1
ZF9-MQ1 + ZF3-KRAB
MYCi975
Цисплатин
% изменения веса тела от исходного уровня
15
10
5
0
-5
-10
0
5
10
15
20
25
День

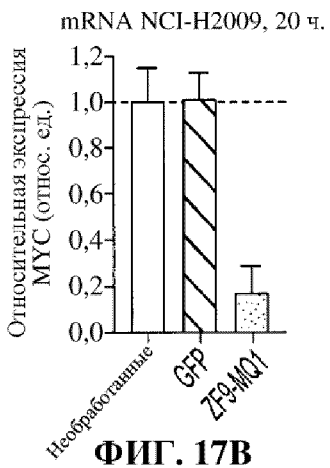
ФИГ. 16C


3 мг/кг, общая доза
% изменения веса тела от исходного уровня
PBS
Отрицательный контроль
ZF9-MQ1
ZF9-MQ1 + ZF3-KRAB
MYCi975
Цисплатин
15
10
5
0
-5
-10
0
5
10
15
20
25
День

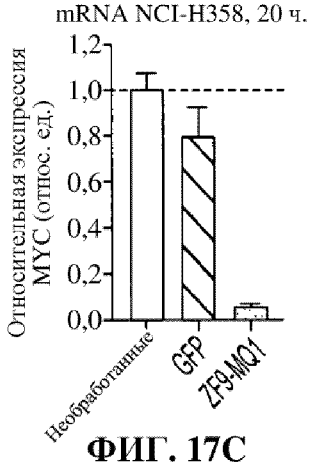
ФИГ. 16D



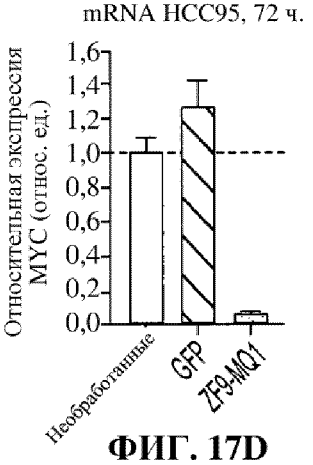

ФИГ. 17A



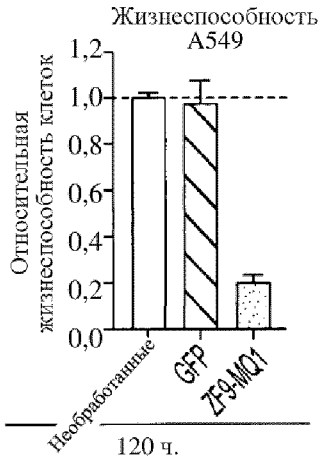

ФИГ. 17B



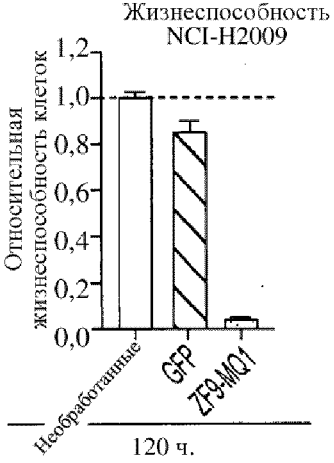

ФИГ. 17C



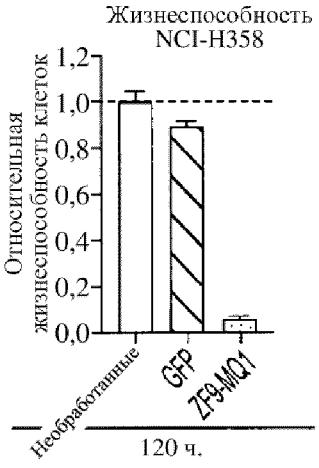

ФИГ. 17D



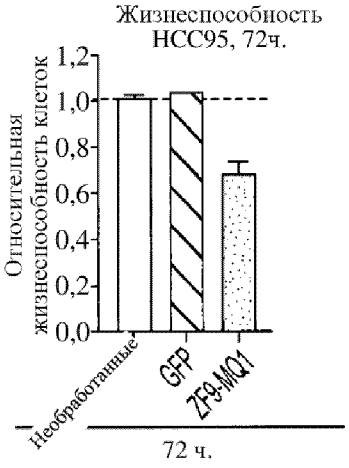

ФИГ. 17E



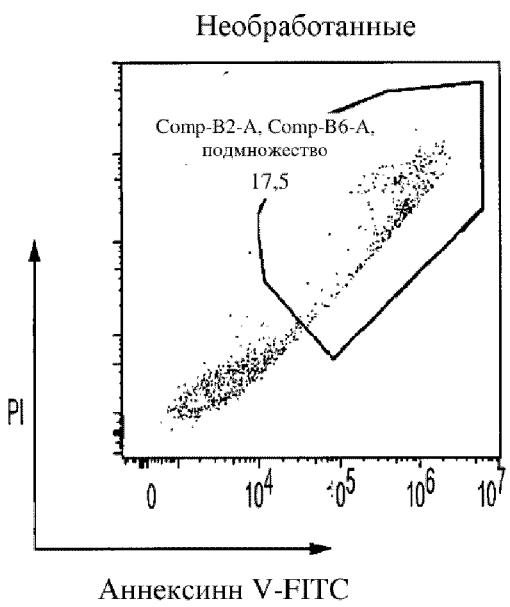

ФИГ. 17F



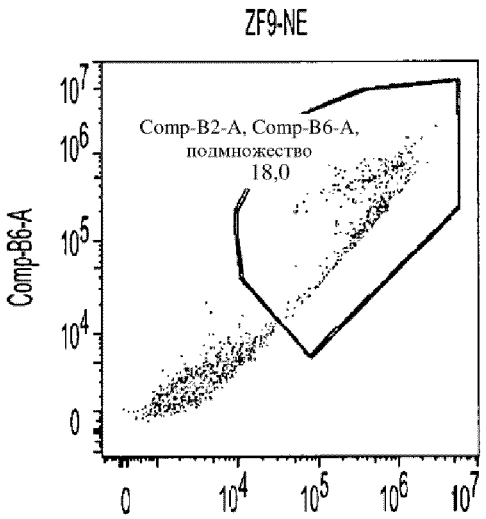

ФИГ. 17G



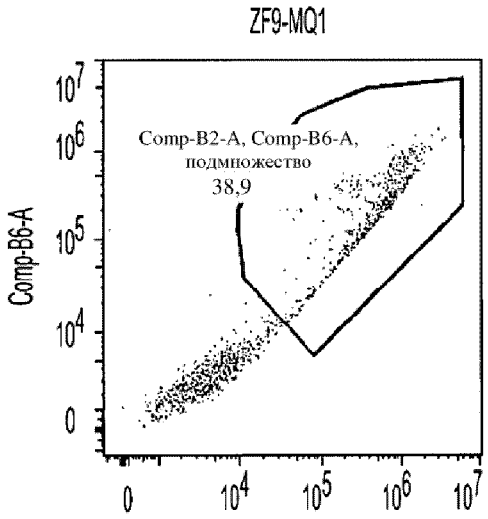

ФИГ. 17H



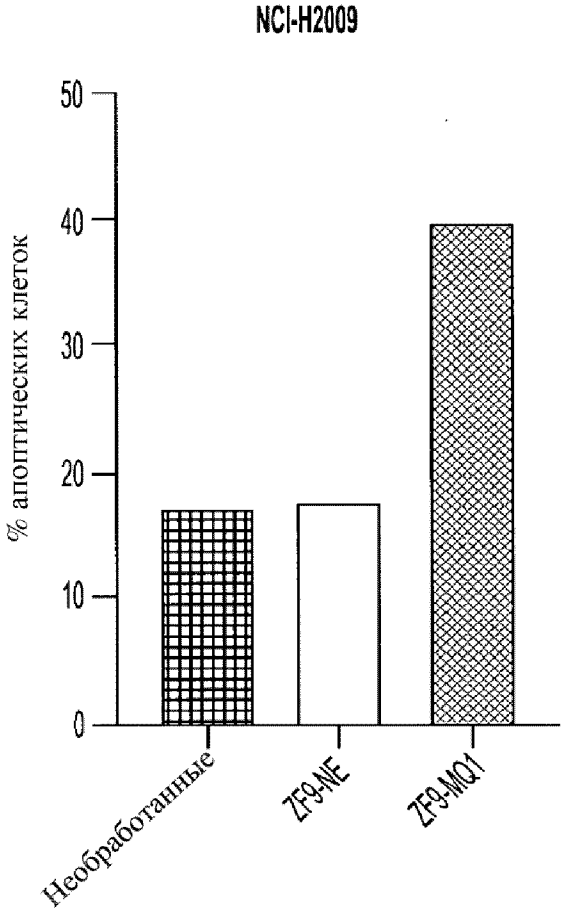

ФИГ. 18А



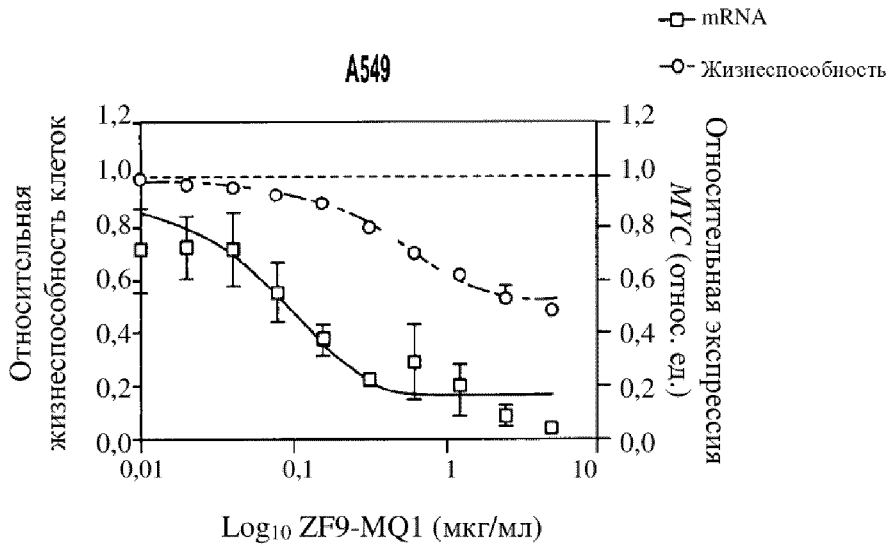

ФИГ. 18В




ФИГ. 18С

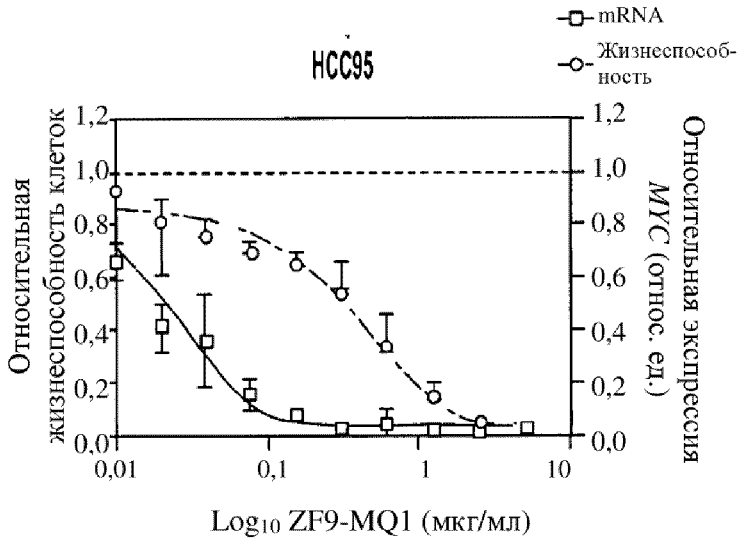

NCI-H2009
% апоптических клеток
50
40
30
20
10
0
Необработанные
ZF9-NE
ZF9-MQ1

**ФИГ. 18D**



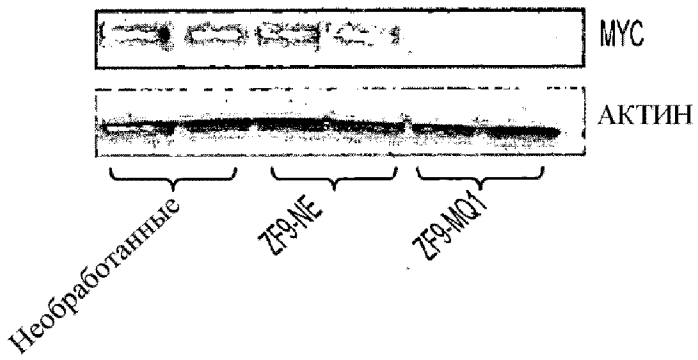

72 ч.

**ФИГ. 19А**

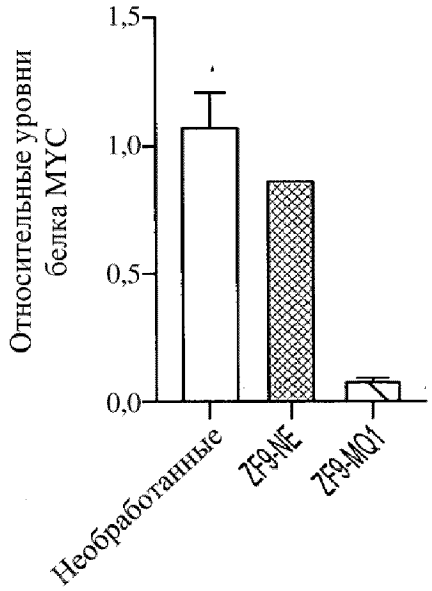



72 ч.

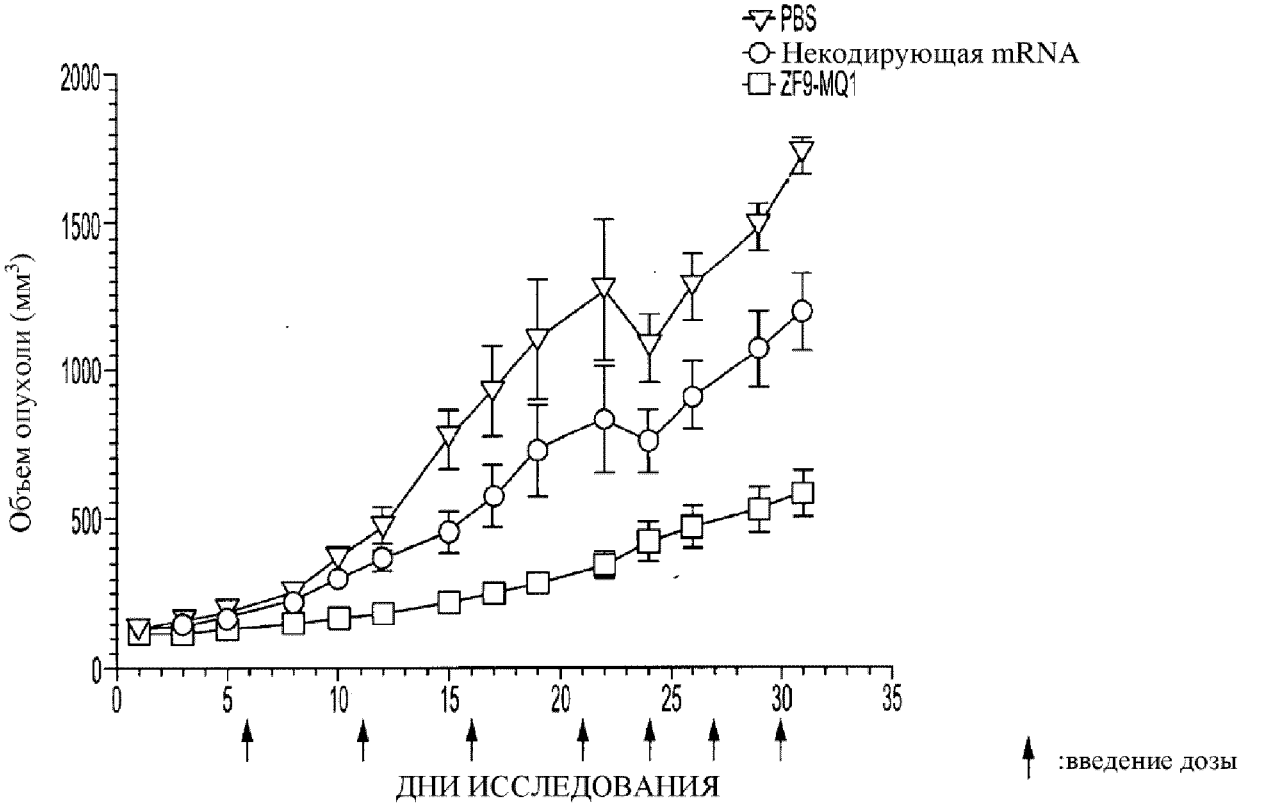
**ФИГ. 19В**



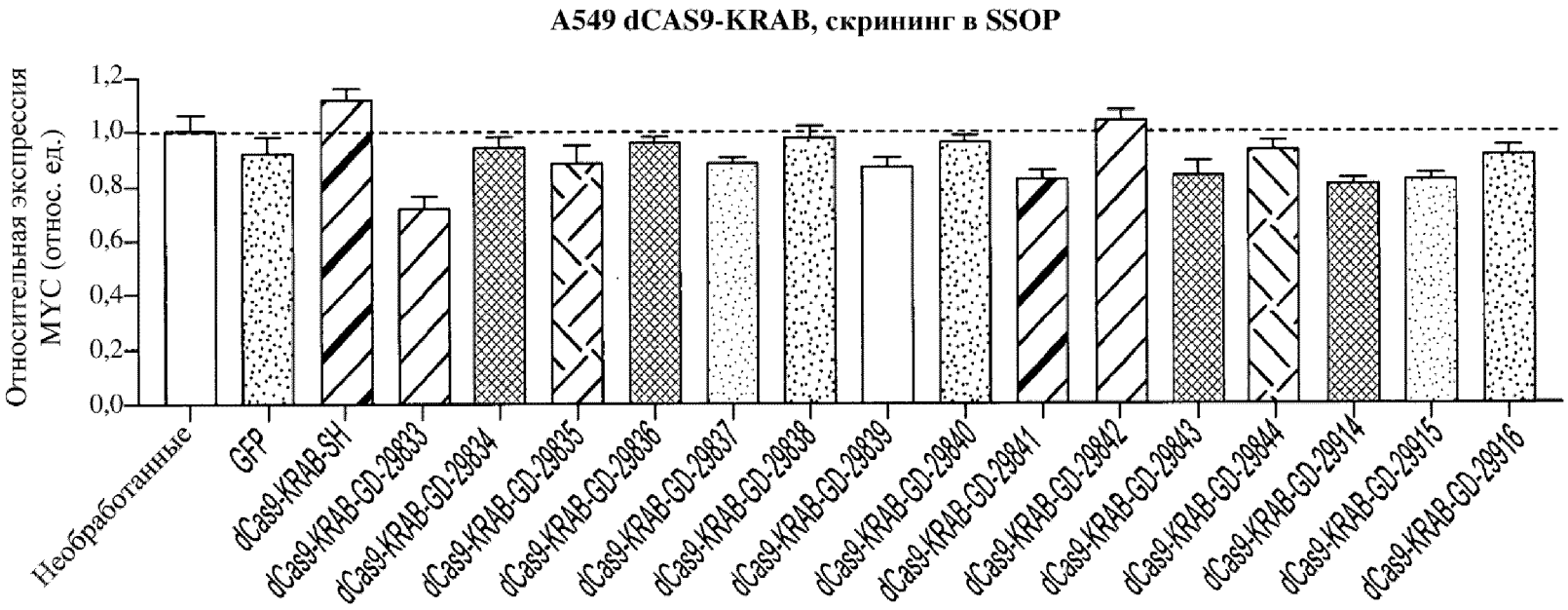

**ФИГ. 20A**



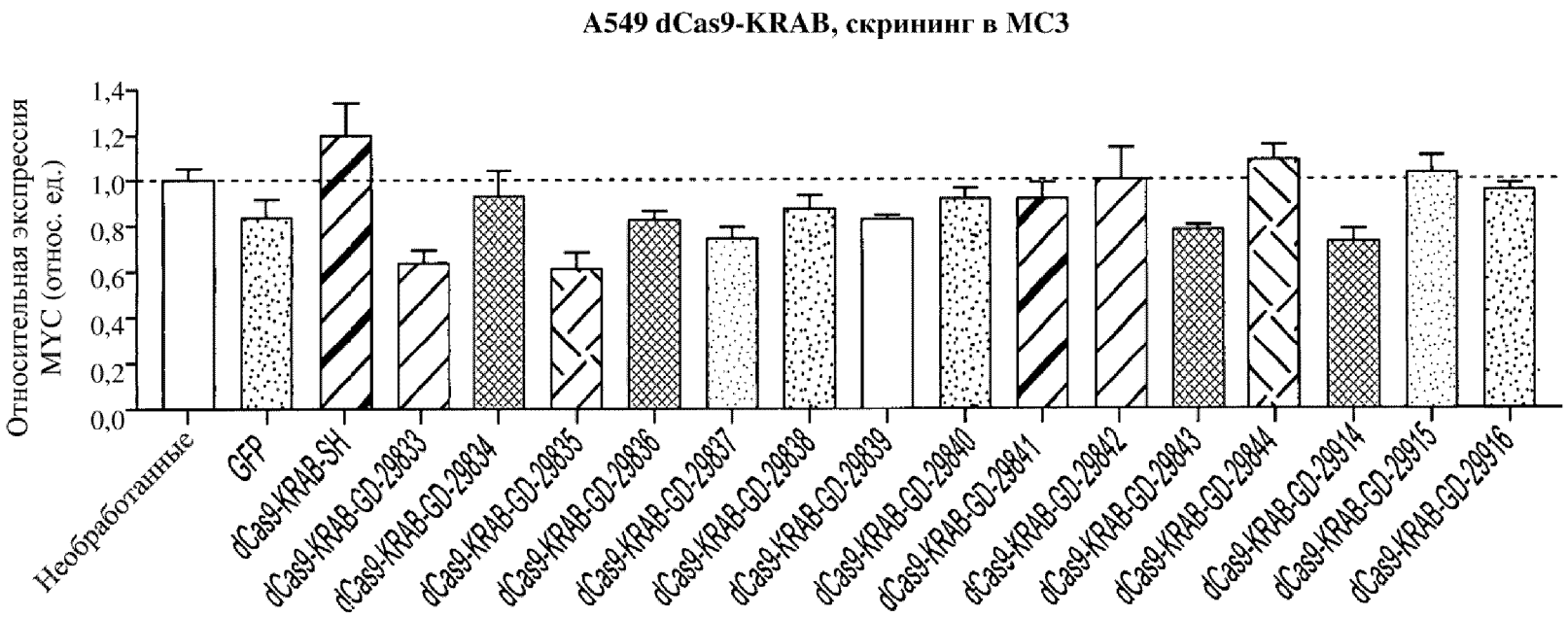

**ФИГ. 20B**


PBS
Некодирующая mRNA
ZF9-MQ1
Объем опухоли (мм3)
2000
1500
1000
500
0
0
5
10
15
20
25
30
35
ДНИ ИССЛЕДОВАНИЯ
:введение дозы

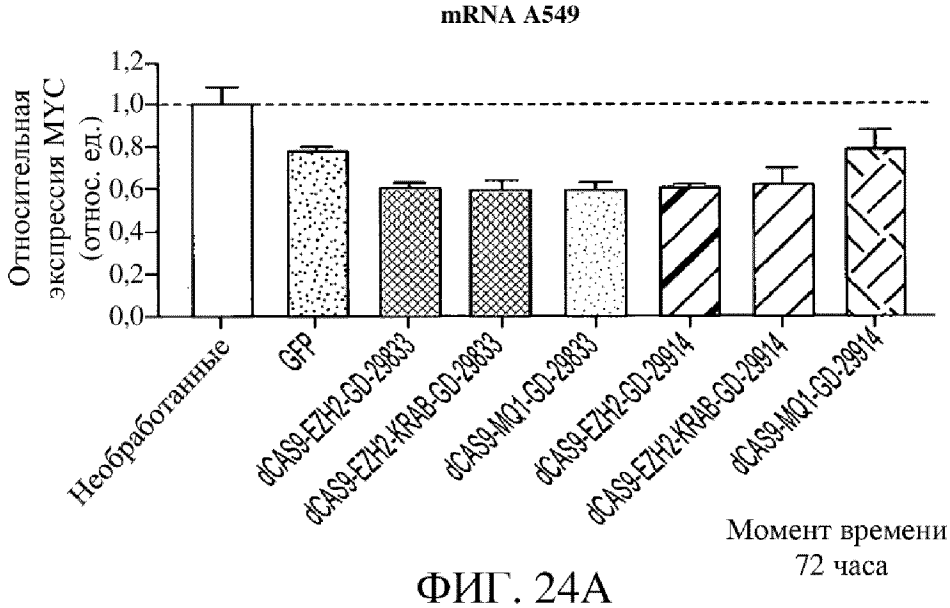
ФИГ. 21


A549 dCAS9-KRAB, скрининг в SSOP
Относительная экспрессия MYC (относ. ед.)
1,2
1,0
0,8
0,6
0,4
0,2
0,0
Необработанные
GFP
dCas9-KRAB-SH
dCas9-KRAB-GD-29833
dCas9-KRAB-GD-29834
dCas9-KRAB-GD-29835
dCas9-KRAB-GD-29836
dCas9-KRAB-GD-29837
dCas9-KRAB-GD-29838
dCas9-KRAB-GD-29839
dCas9-KRAB-GD-29840
dCas9-KRAB-GD-29841
dCas9-KRAB-GD-29842
dCas9-KRAB-GD-29843
dCas9-KRAB-GD-29844
dCas9-KRAB-GD-29914
dCas9-KRAB-GD-29915
dCas9-KRAB-GD-29916

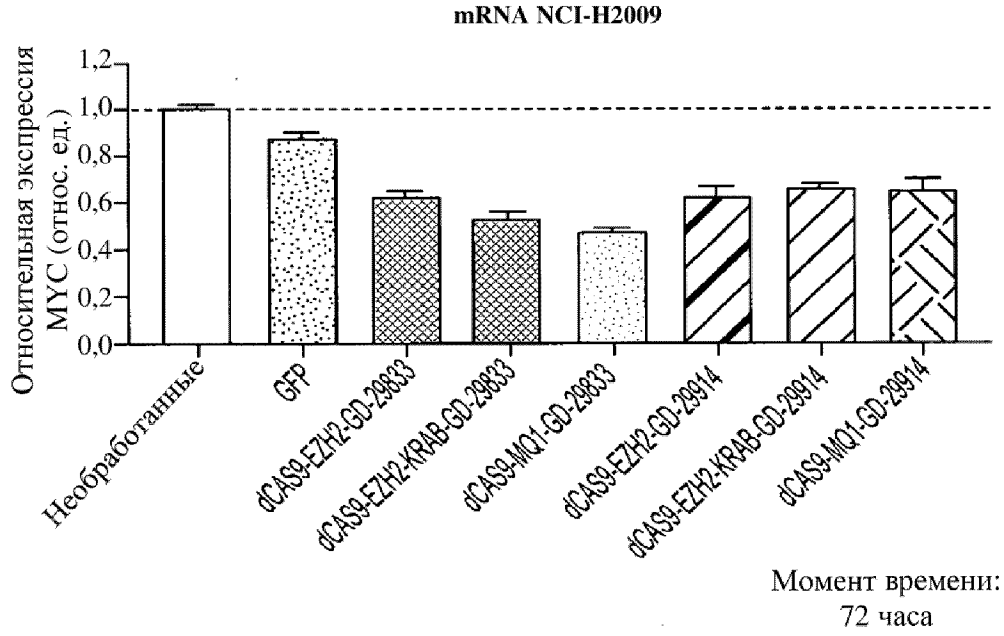
ФИГ. 22


A549 dCas9-KRAB, скрининг в MC3
Относительная экспрессия MYC (относ. ед.)
1,4
1,2
1,0
0,8
0,6
0,4
0,2
0,0
Необработанные
GFP
dCas9-KRAB-SH
dCas9-KRAB-GD-29833
dCas9-KRAB-GD-29834
dCas9-KRAB-GD-29835
dCas9-KRAB-GD-29836
dCas9-KRAB-GD-29837
dCas9-KRAB-GD-29838
dCas9-KRAB-GD-29839
dCas9-KRAB-GD-29840
dCas9-KRAB-GD-29841
dCas9-KRAB-GD-29842
dCas9-KRAB-GD-29843
dCas9-KRAB-GD-29844
dCas9-KRAB-GD-29914
dCas9-KRAB-GD-29915
dCas9-KRAB-GD-29916

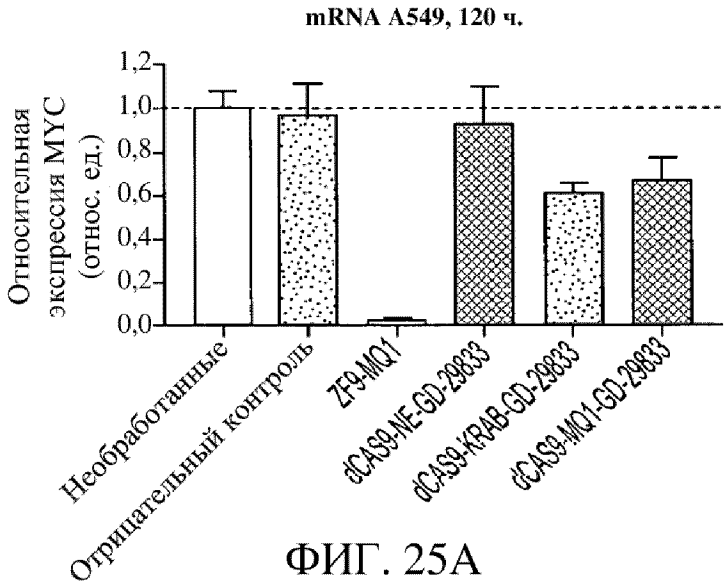
ФИГ. 23



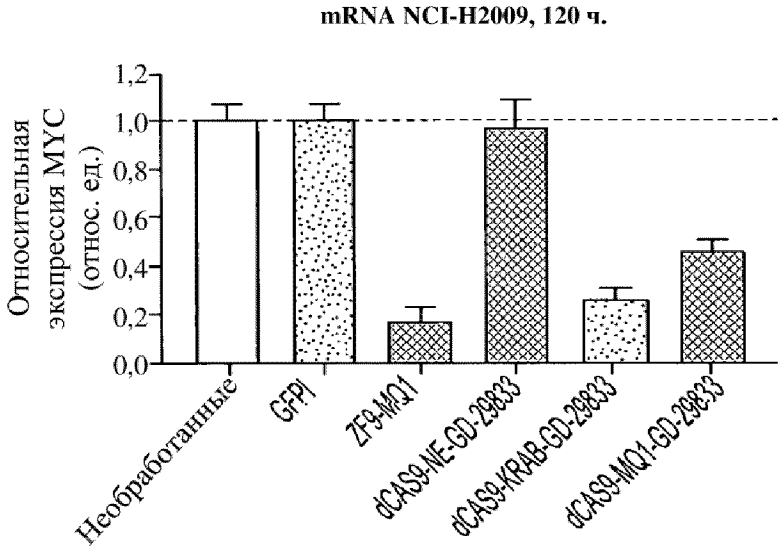

ФИГ. 24А



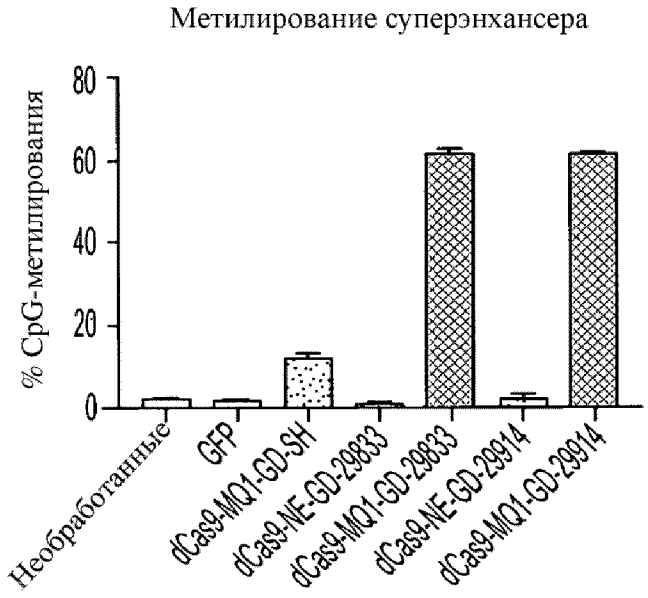

ФИГ. 24В



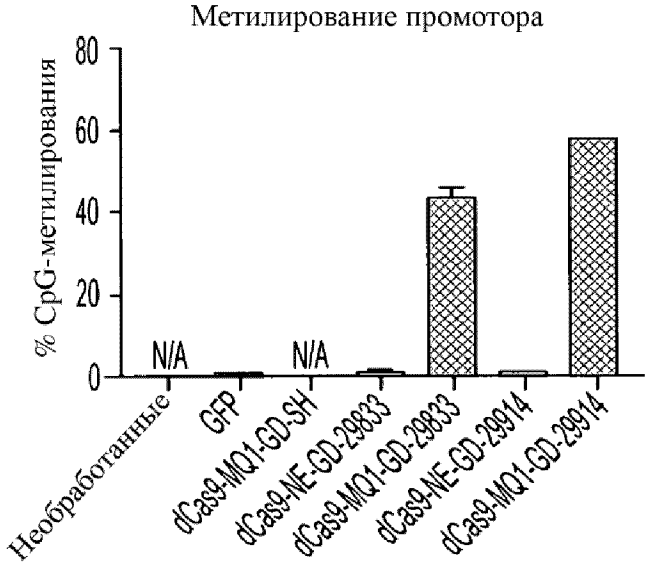

ФИГ. 25А




ФИГ. 25В




ФИГ. 26A

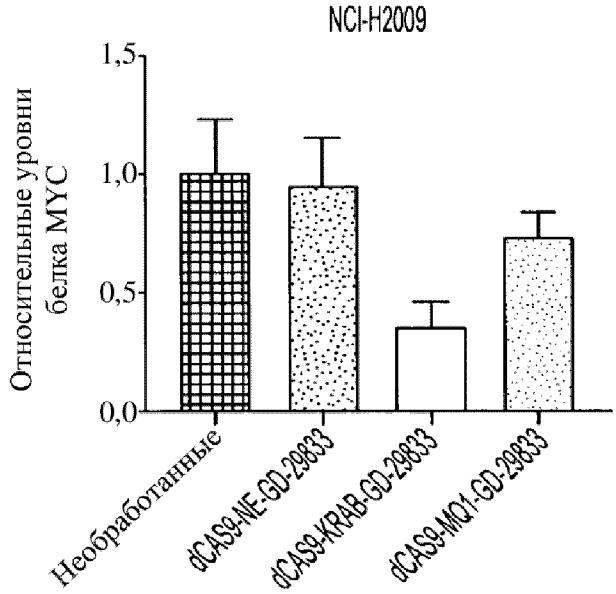



ФИГ. 26B

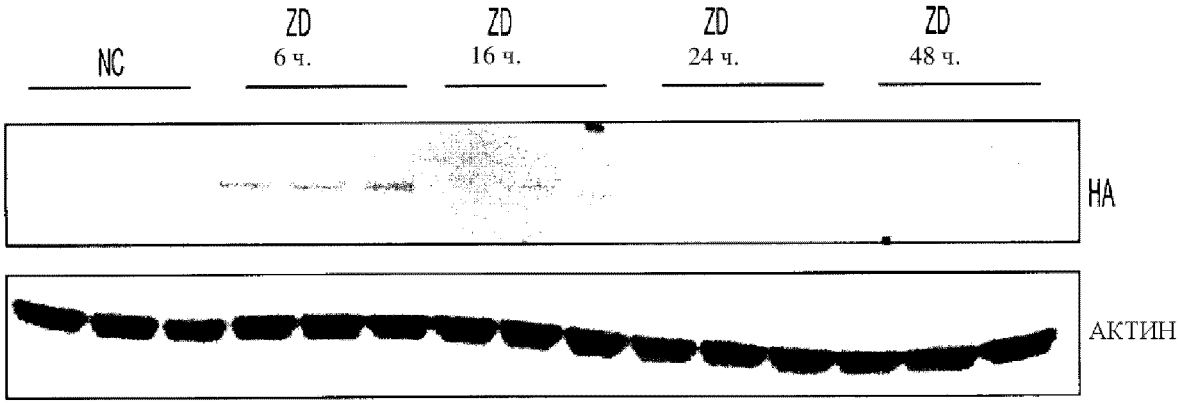



1-3: Необработанные
4-5: dCAS9-NE-GD-29833
6-8: dCAS9-KRAB-GD-29833
9-10: dCAS9-MQ1-GD-29833

ФИГ. 27A

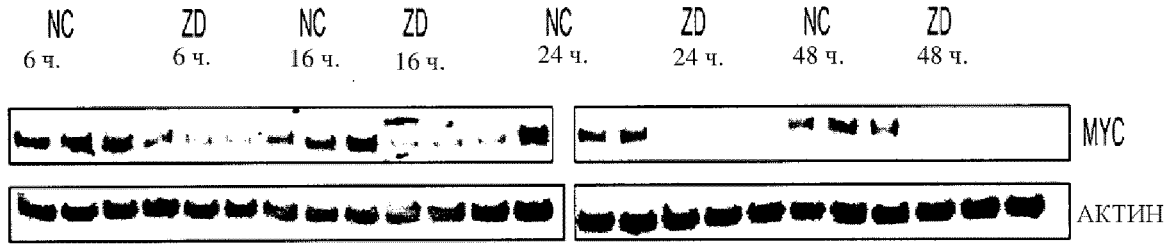



ФИГ. 27B



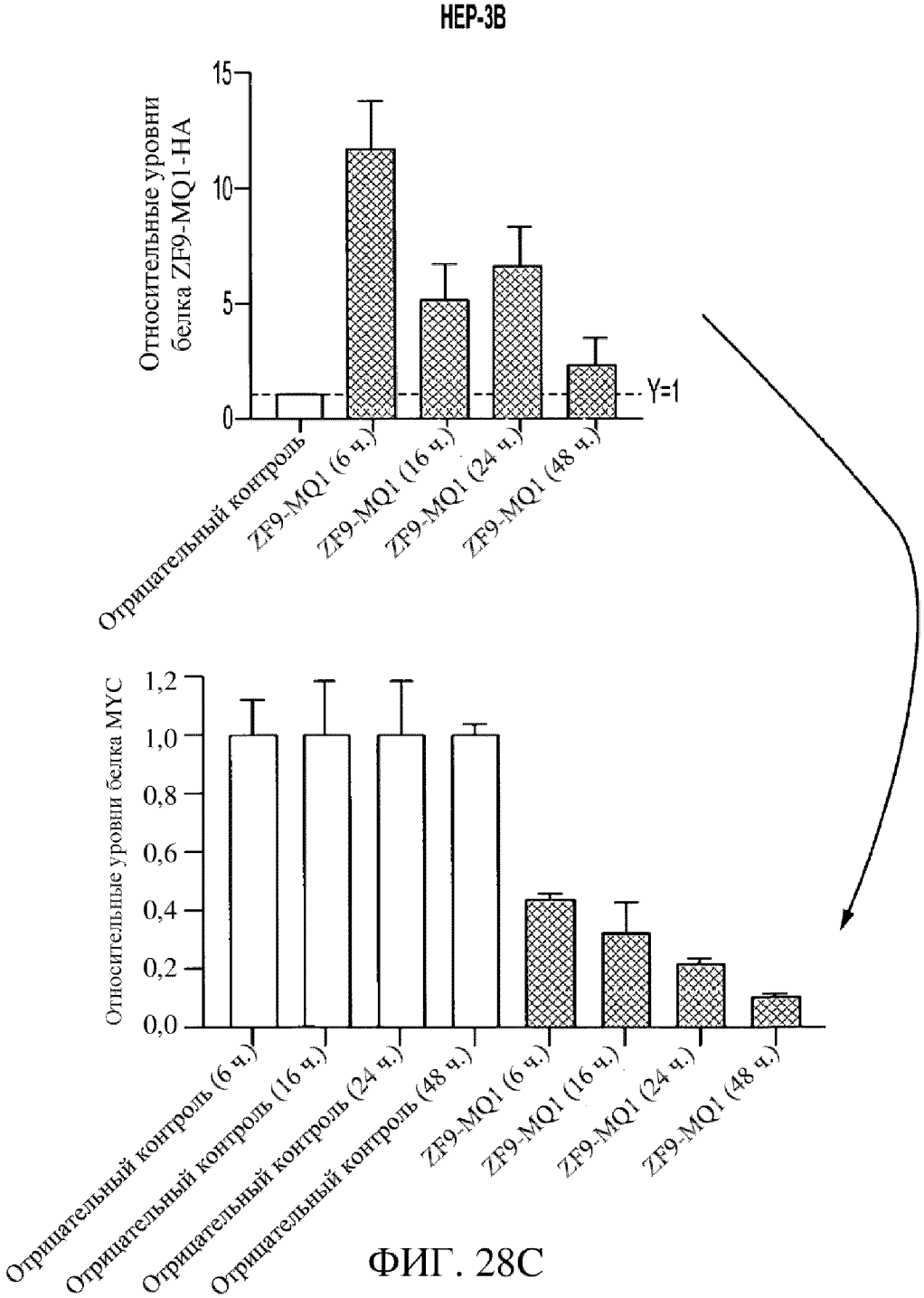

NC: Отрицательный контроль
ZD: ZF9-MQ1

ФИГ. 28A

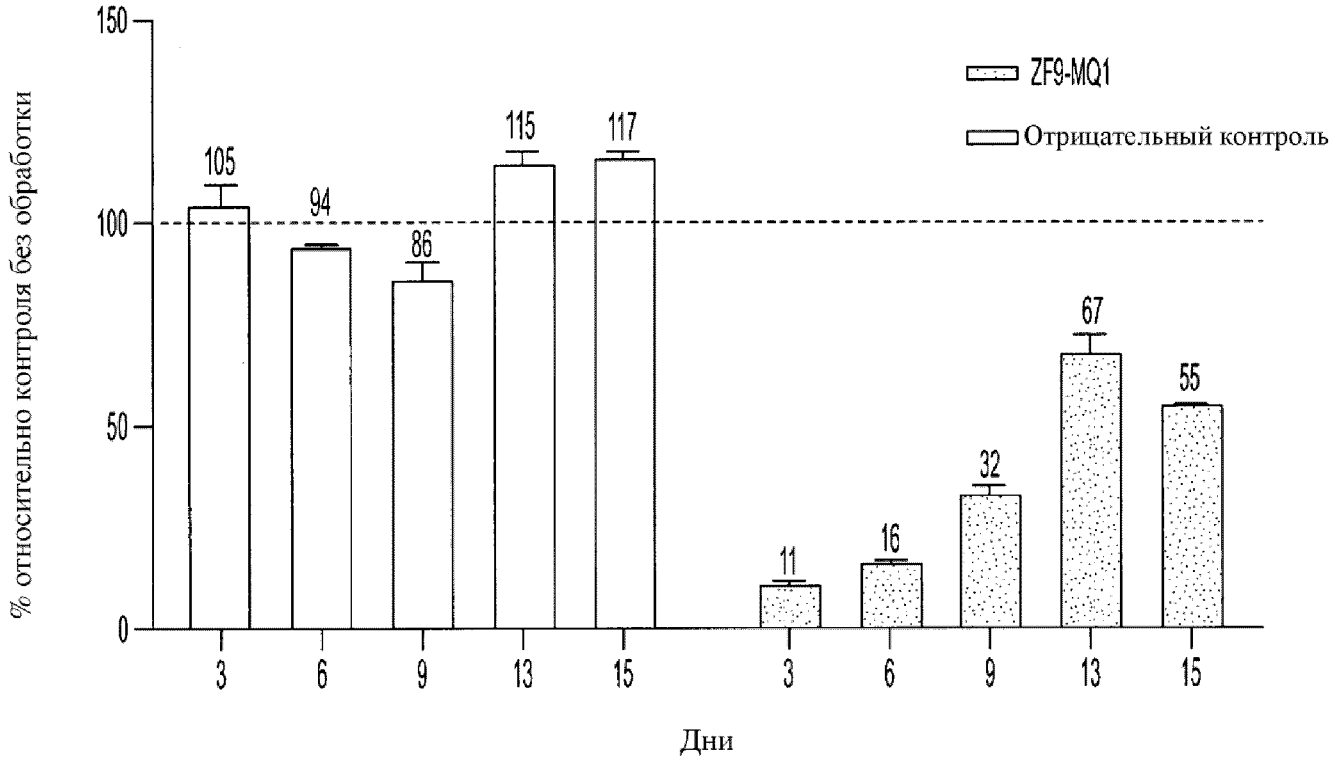



NC: Отрицательный контроль
ZD: ZF9-MQ1

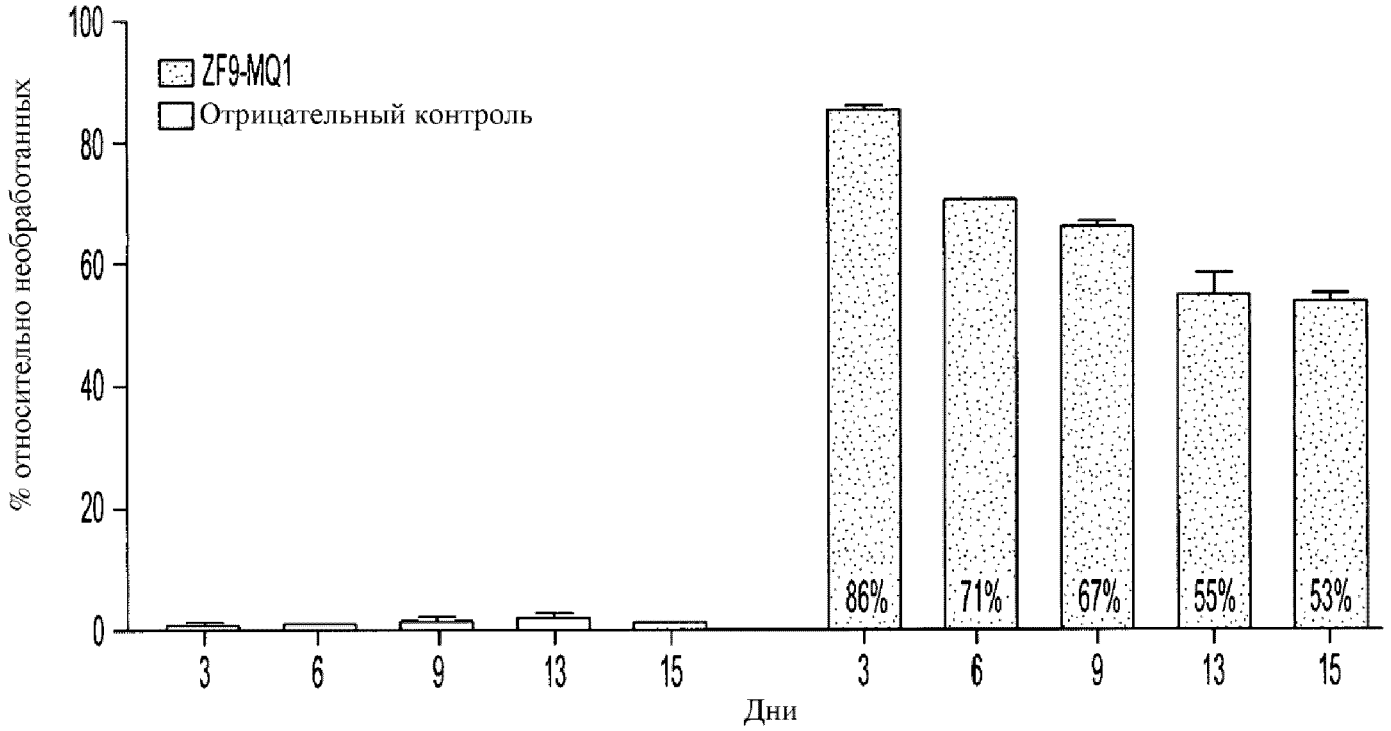
ФИГ. 28B


HEP-3B
Относительные уровни белка ZF9-MQ1-HA
15
10
5
0
Y=1
Отрицательный контроль
ZF9-MQ1 (6 ч.)
ZF9-MQ1 (16 ч.)
ZF9-MQ1 (24 ч.)
ZF9-MQ1 (48 ч.)
Относительные уровни белка MYC
1,2
1,0
0,8
0,6
0,4
0,2
0,0
Отрицательный контроль (6 ч.)
Отрицательный контроль (16 ч.)
Отрицательный контроль (24 ч.)
Отрицательный контроль (48 ч.)
ZF9-MQ1 (6 ч.)
ZF9-MQ1 (16 ч.)
ZF9-MQ1 (24 ч.)
ZF9-MQ1 (48 ч.)

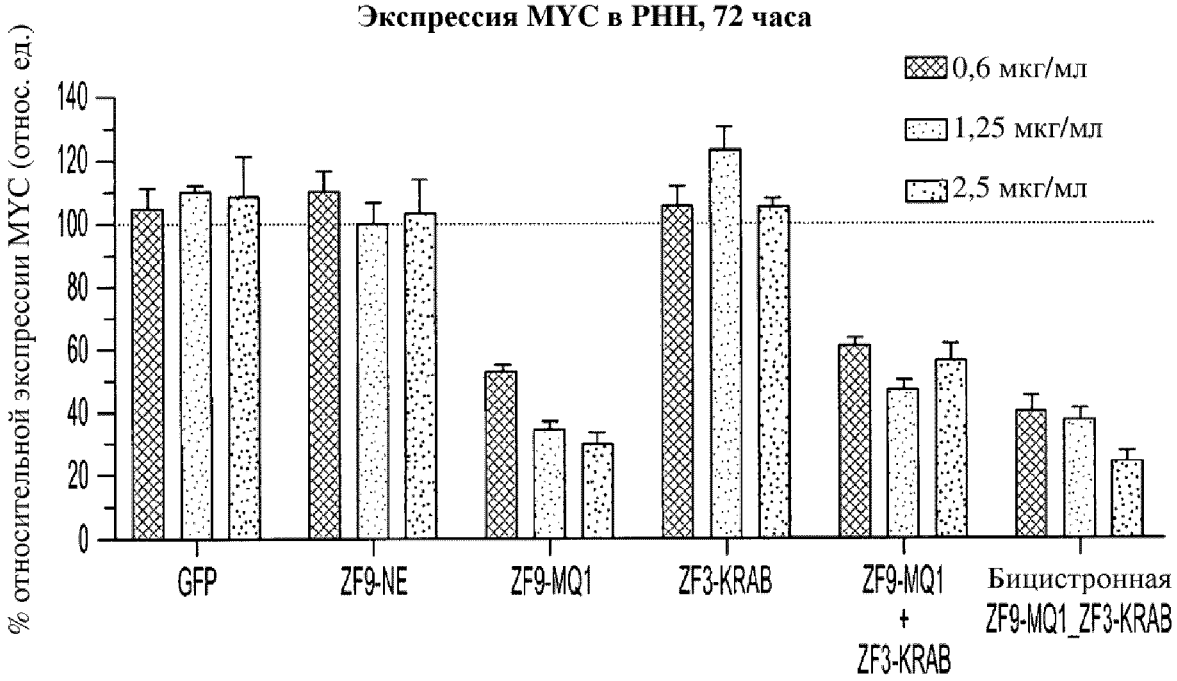
ФИГ. 28С


150
100
50
0
% относительно контроля без обработки
ZF9-MQ1
Отрицательный контроль
105
94
86
115
117
11
16
32
67
55
3
6
9
13
15
3
6
9
13
15
Дни

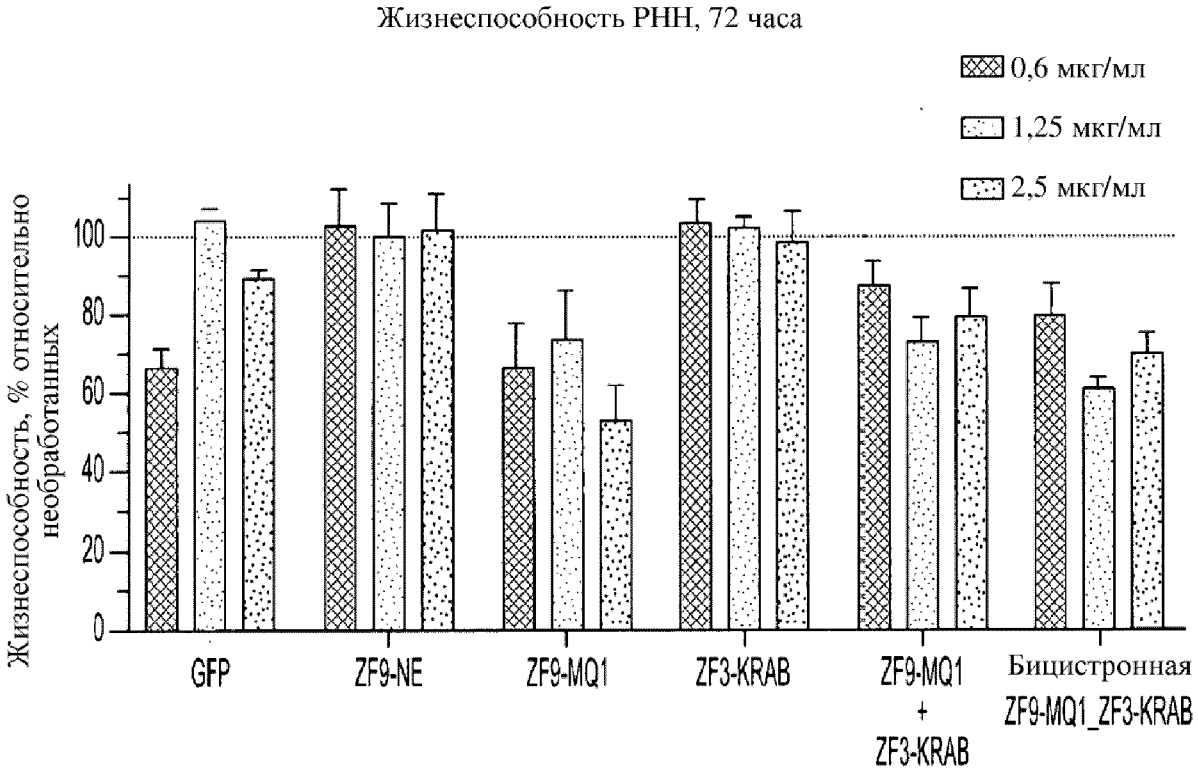
ФИГ. 29А


100
80
60
40
20
0
% относительно необработанных
ZF9-MQ1
Отрицательный контроль
86%
71%
67%
55%
53%
3
6
9
13
15
3
6
9
13
15
Дни

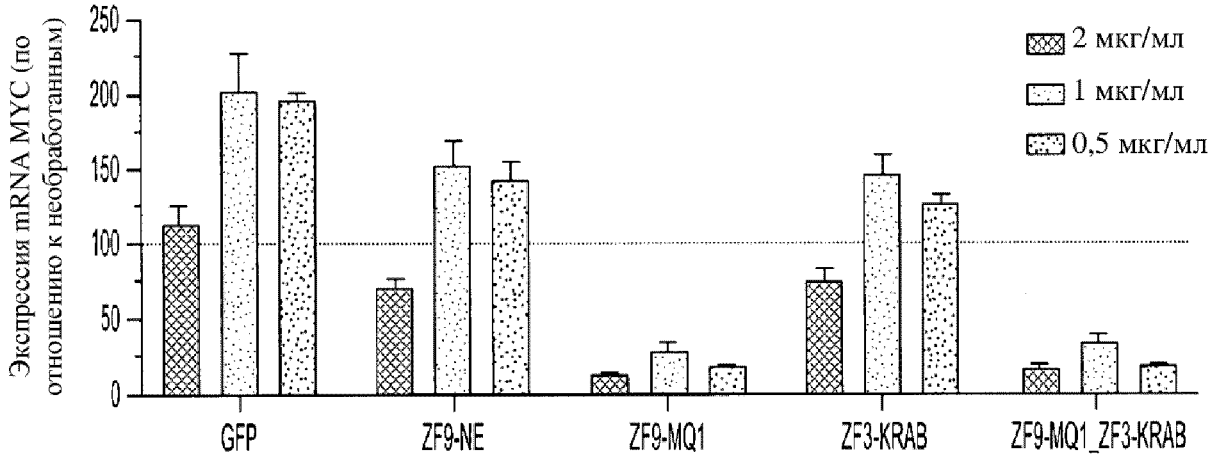
ФИГ. 29B


Экспрессия MYC в РНН, 72 часа
% относительной экспрессии MYC (относ. ед.)
0,6 мкг/мл
1,25 мкг/мл
2,5 мкг/мл
140
120
100
80
60
40
20
0
GFP
ZF9-NE
ZF9-MQ1
ZF3-KRAB
ZF9-MQ1 + ZF3-KRAB
Бицистронная ZF9-MQ1_ZF3-KRAB

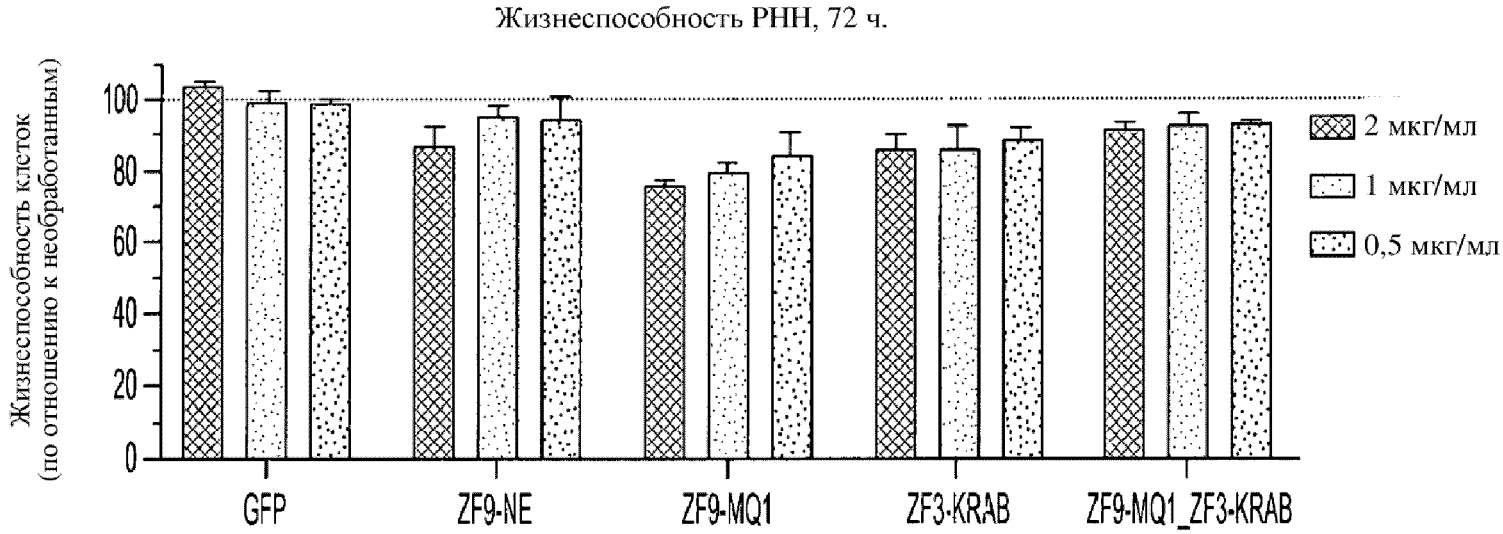
ФИГ. 30А


Жизнеспособность РНН, 72 часа
0,6 мкг/мл
1,25 мкг/мл
2,5 мкг/мл
Жизнеспособность, % относительно необработанных
0
20
40
60
80
100
GFP
ZF9-NE
ZF9-MQ1
ZF3-KRAB
ZF9-MQ1 + ZF3-KRAB
Бицистронная ZF9-MQ1_ZF3-KRAB

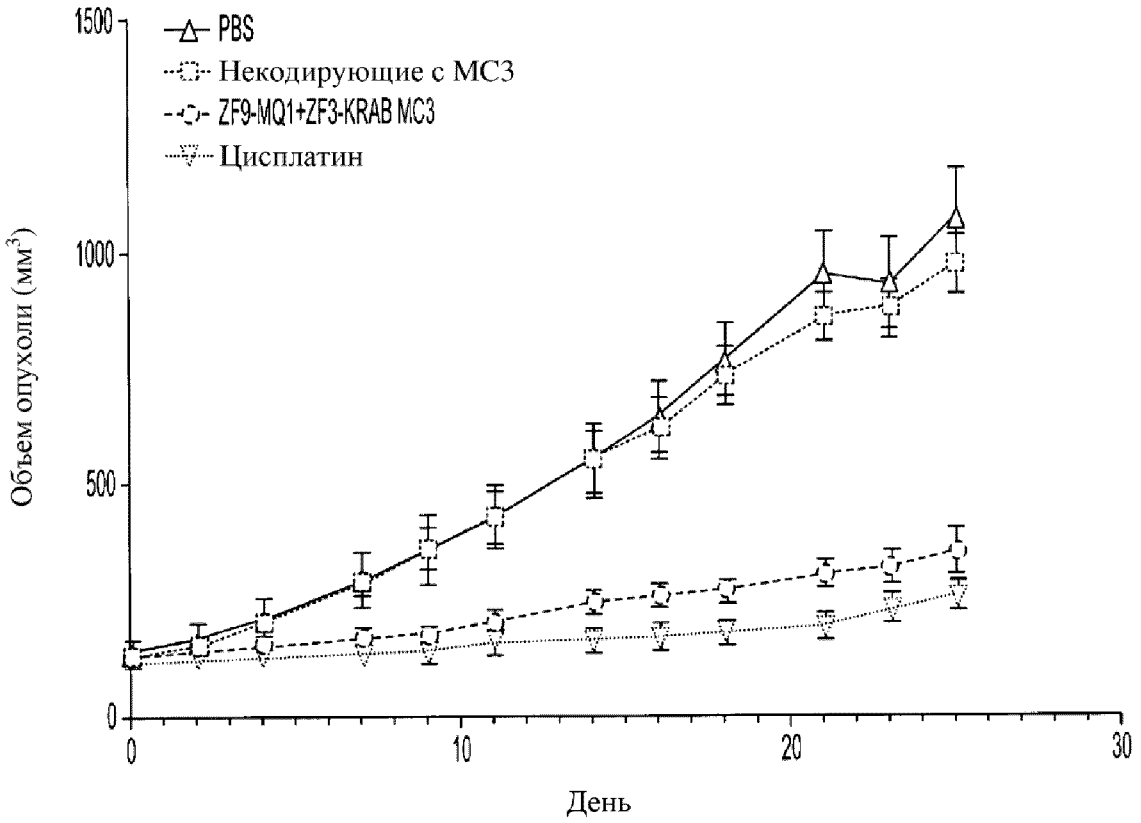
ФИГ. 30В


Экспрессия mRNA MYC (по отношению к необработанным)
250
200
150
100
50
0
2 мкг/мл
1 мкг/мл
0,5 мкг/мл
GFP
ZF9-NE
ZF9-MQ1
ZF3-KRAB
ZF9-MQ1_ZF3-KRAB

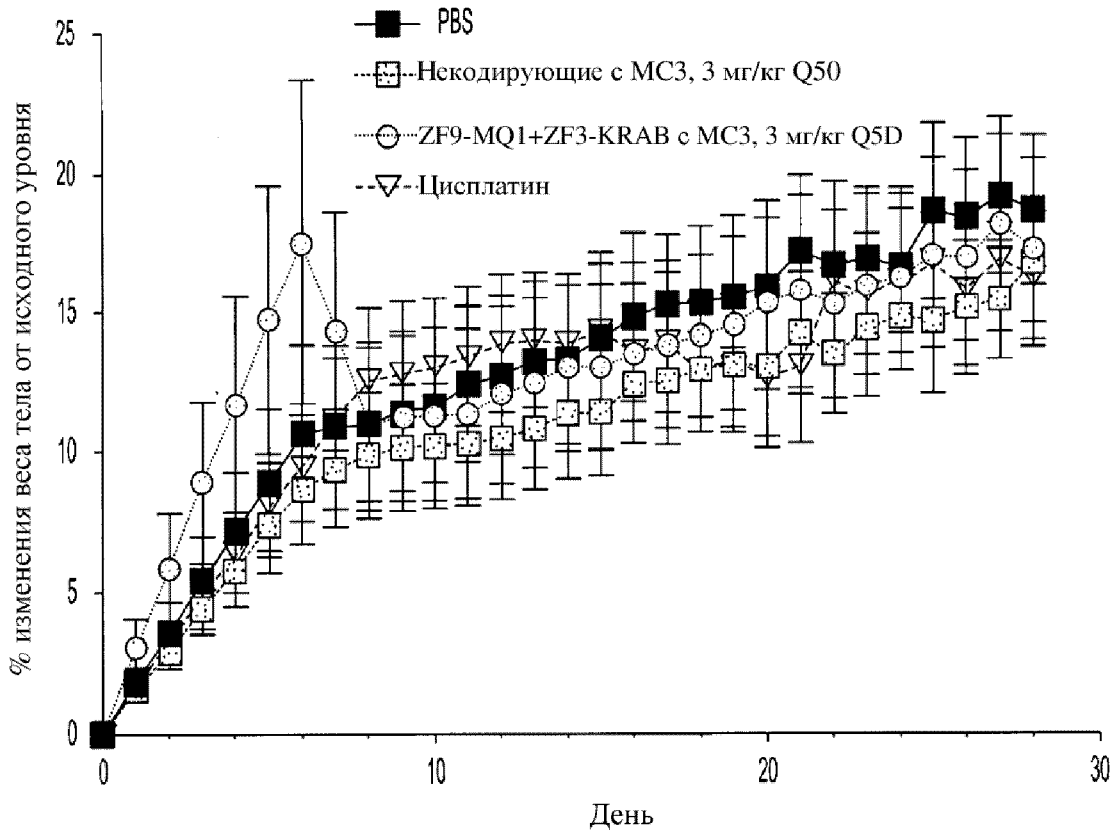
ФИГ. 30С


Жизнеспособность РНН, 72 ч.
Жизнеспособность клеток
(по отношению к необработанным)
100
80
60
40
20
0
GFP
ZF9-NE
ZF9-MQ1
ZF3-KRAB
ZF9-MQ1_ZF3-KRAB
2 мкг/мл
1 мкг/мл
0,5 мкг/мл

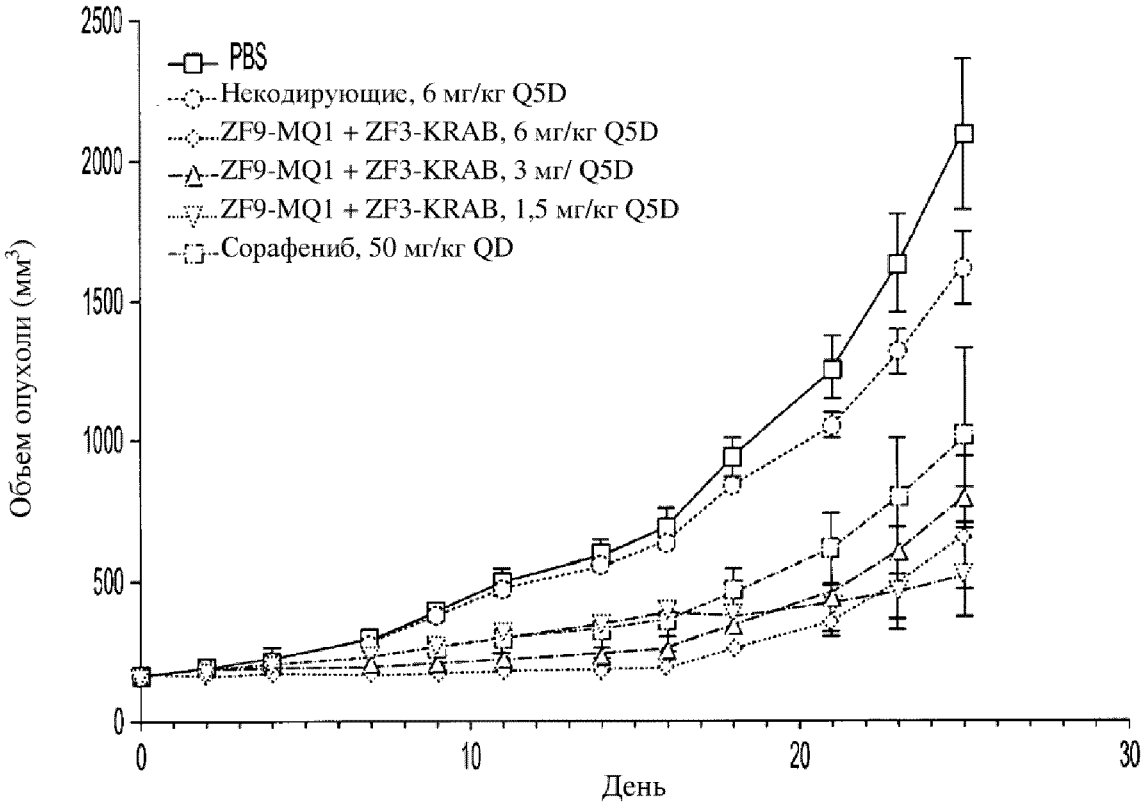
ФИГ. 30D


PBS
Некодирующие с MC3
ZF9-MQ1+ZF3-KRAB MC3
Цисплатин
Объем опухоли (мм3)
1500
1000
500
0
0
10
20
30
День

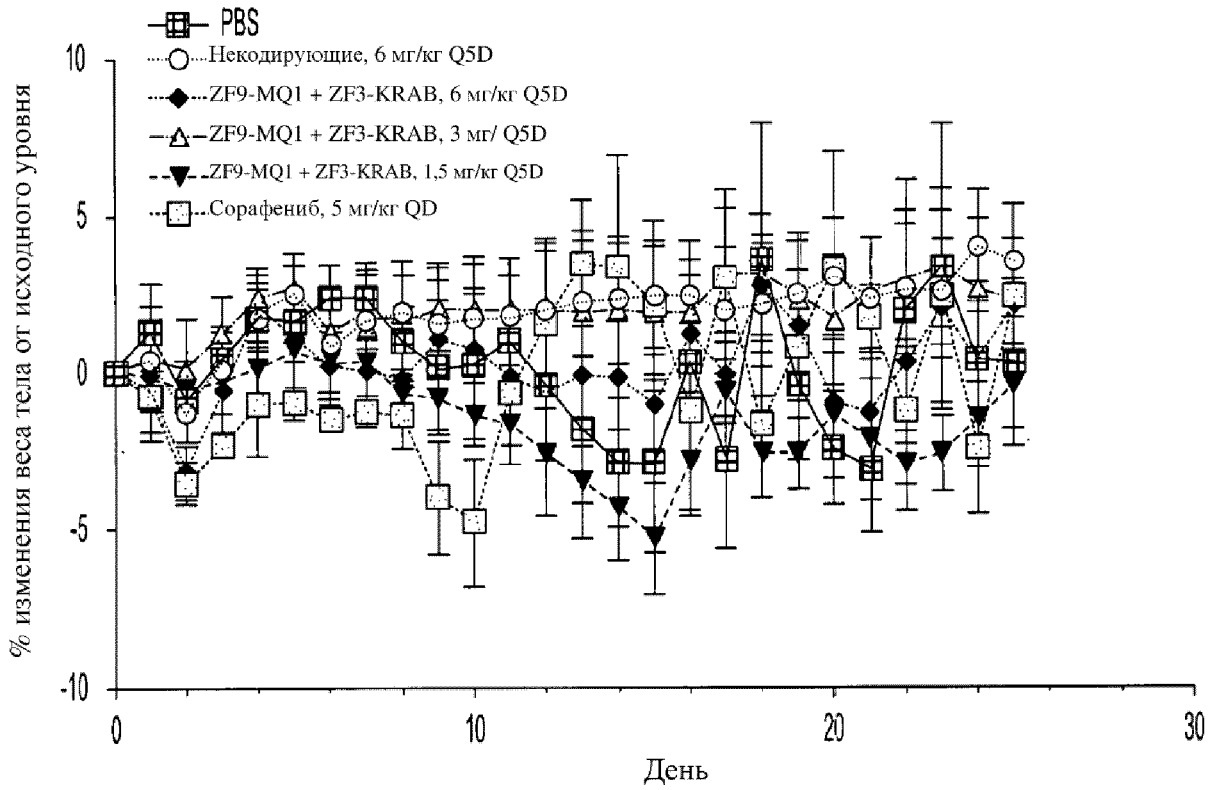
ФИГ. 31А


PBS
Некодирующие с MC3, 3 мг/кг Q50
ZF9-MQ1+ZF3-KRAB с MC3, 3 мг/кг Q5D
Цисплатин
% изменения веса тела от исходного уровня
День
0
5
10
15
20
25
0
10
20
30

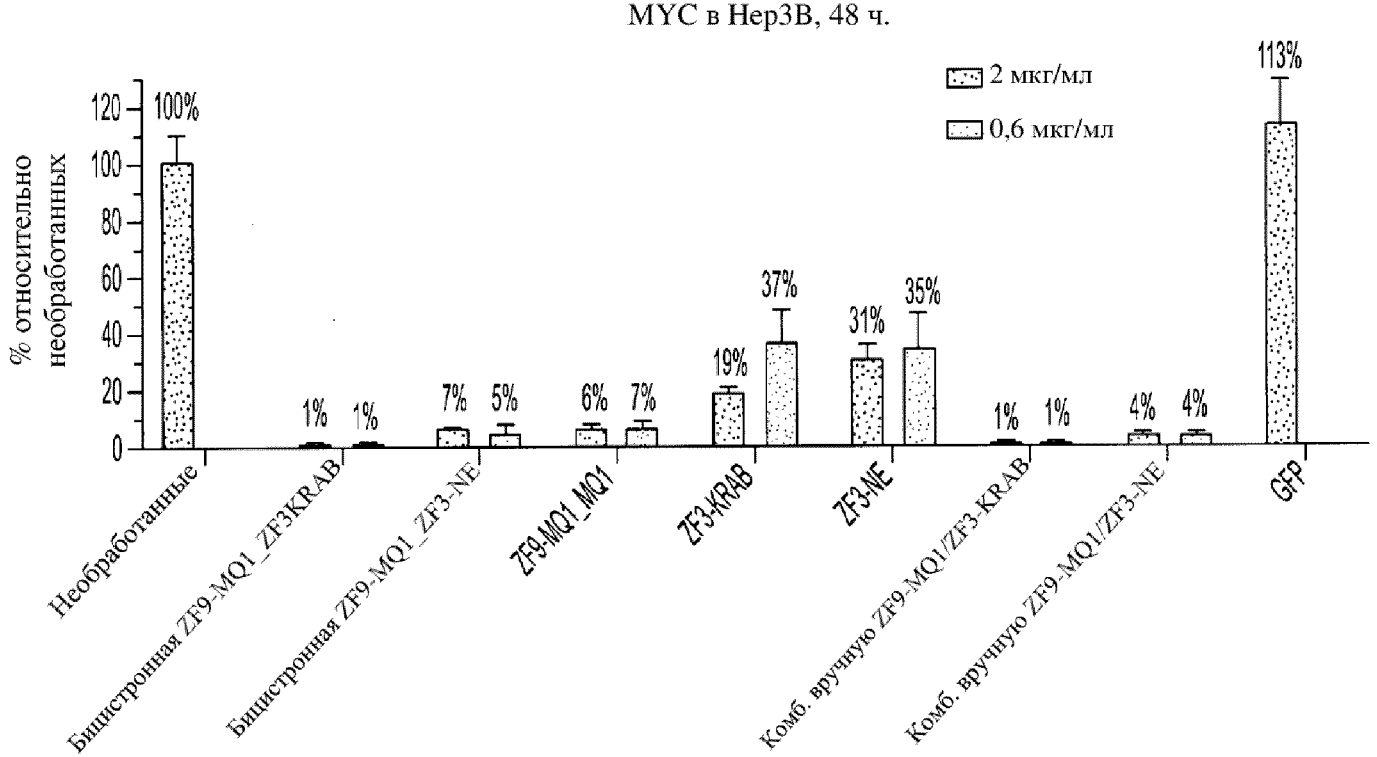
ФИГ. 31B


2500
2000
1500
1000
500
0
0
10
20
30
Объем опухоли (мм3)
День
PBS
Некодирующие, 6 мг/кг Q5D
ZF9-MQ1 + ZF3-KRAB, 6 мг/кг Q5D
ZF9-MQ1 + ZF3-KRAB, 3 мг/ Q5D
ZF9-MQ1 + ZF3-KRAB, 1,5 мг/кг Q5D
Сорафениб, 50 мг/кг QD

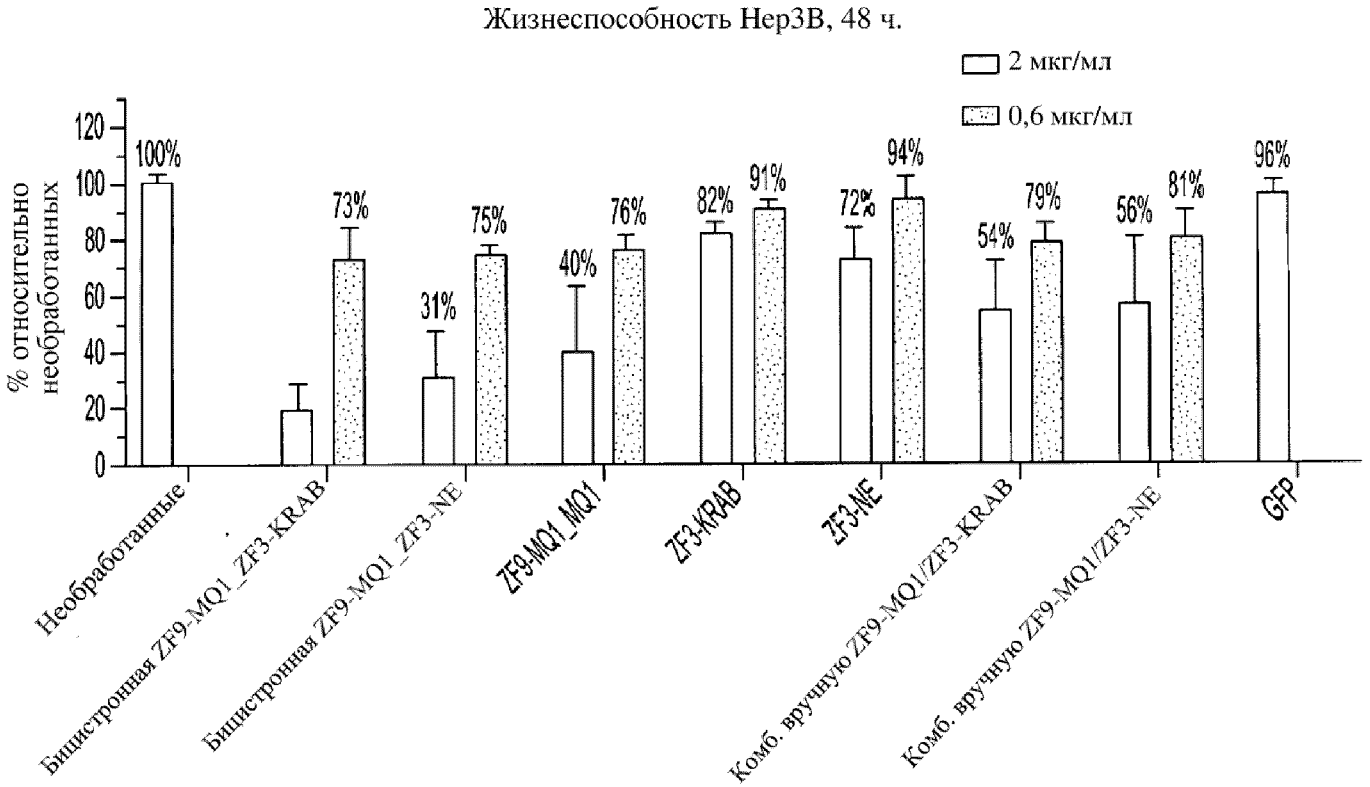
ФИГ. 32А


PBS
Некодирующие, 6 мг/кг Q5D
ZF9-MQ1 + ZF3-KRAB, 6 мг/кг Q5D
ZF9-MQ1 + ZF3-KRAB, 3 мг/ Q5D
ZF9-MQ1 + ZF3-KRAB, 1,5 мг/кг Q5D
Сорафениб, 5 мг/кг QD
% изменения веса тела от исходного уровня
10
5
0
-5
-10
0
10
20
30
День

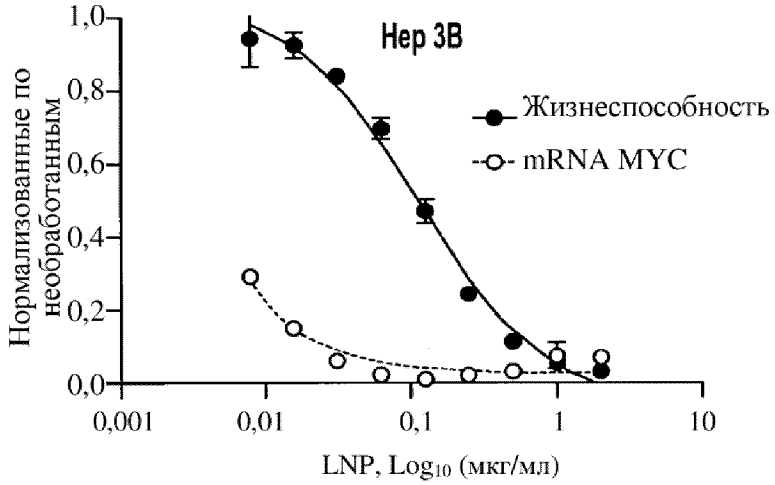
ФИГ. 32B


MYC в Hep3B, 48 ч.
2 мкг/мл
0,6 мкг/мл
% относительно необработанных
120
100
80
60
40
20
0
100%
1%
1%
7%
5%
6%
7%
19%
37%
31%
35%
1%
1%
4%
4%
113%
Необработанные
Бицистронная ZF9-MQ1_ZF3KRAB
Бицистронная ZF9-MQ1_ZF3-NE
ZF9-MQ1_MQ1
ZF3-KRAB
ZF3-NE
Комб. вручную ZF9-MQ1/ZF3-KRAB
Комб. вручную ZF9-MQ1/ZF3-NE
GFP

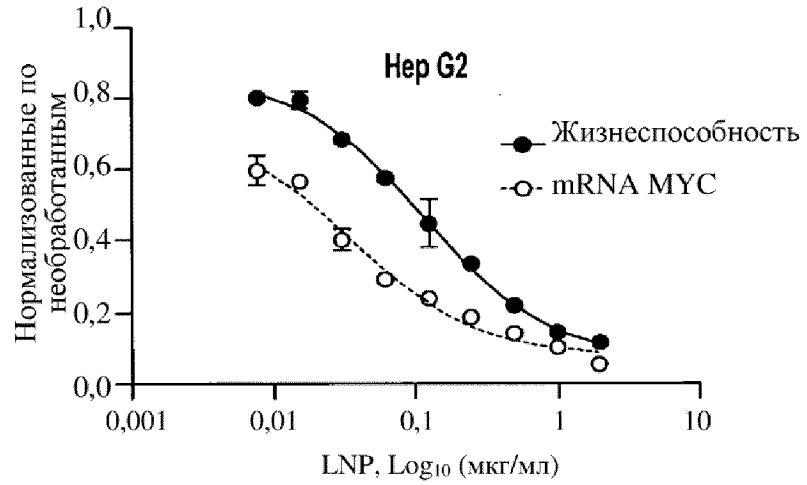
ФИГ. 33А


Жизнеспособность Hep3B, 48 ч.
2 мкг/мл
0,6 мкг/мл
% относительно необработанных
120
100
80
60
40
20
0
100%
73%
31%
75%
40%
76%
82%
91%
72%
94%
54%
79%
56%
81%
96%
Необработанные
Бицистронная ZF9-MQ1_ZF3-KRAB
Бицистронная ZF9-MQ1_ZF3-NE
ZF9-MQ1_MQ1
ZF3-KRAB
ZF3-NE
Комб. вручную ZF9-MQ1/ZF3-KRAB
Комб. вручную ZF9-MQ1/ZF3-NE
GFP

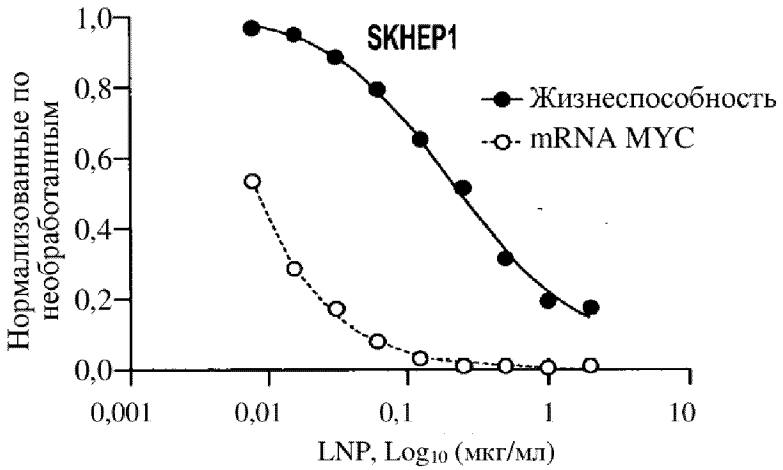
ФИГ. 33B




ФИГ. 34А



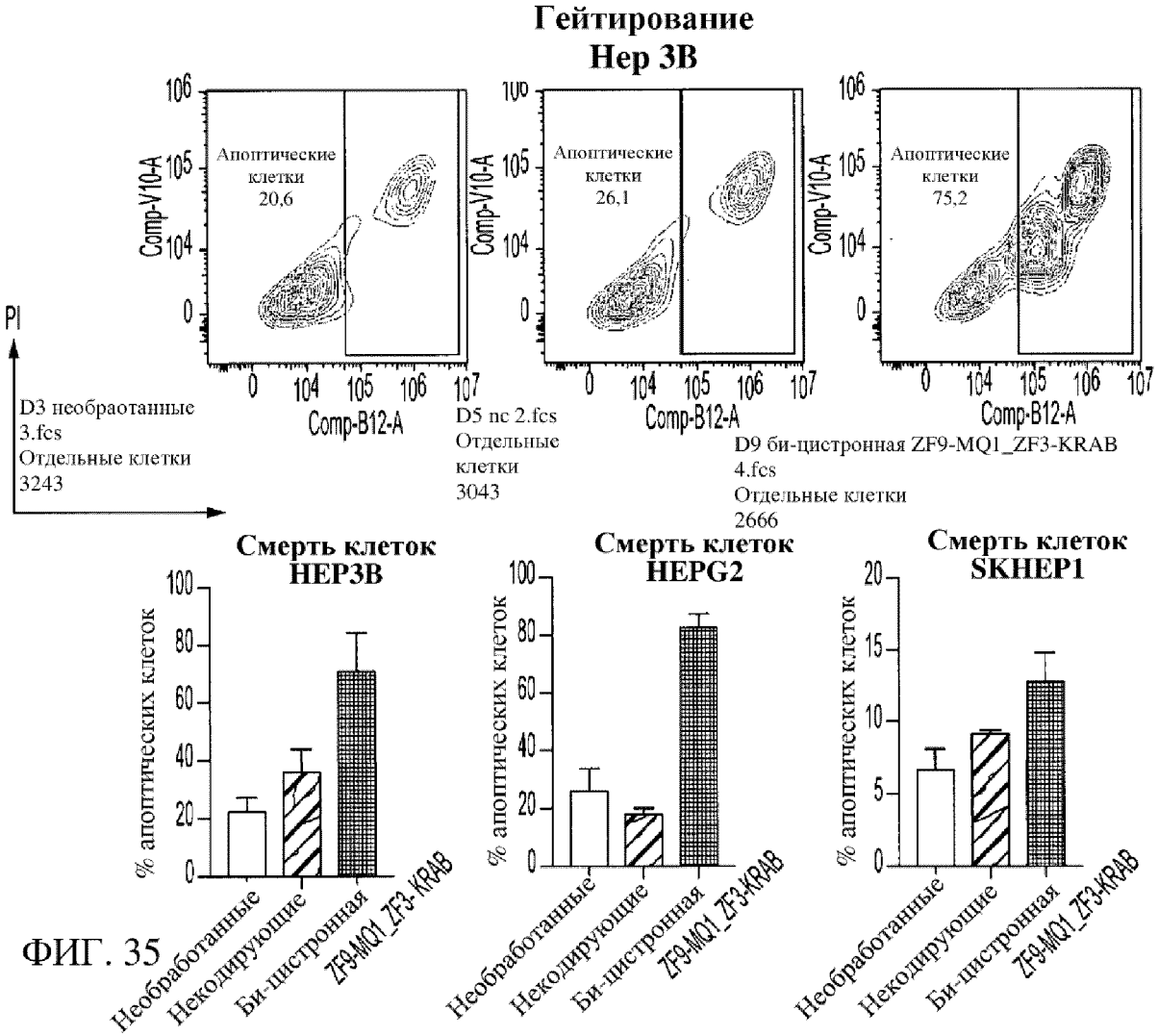

ФИГ. 34В



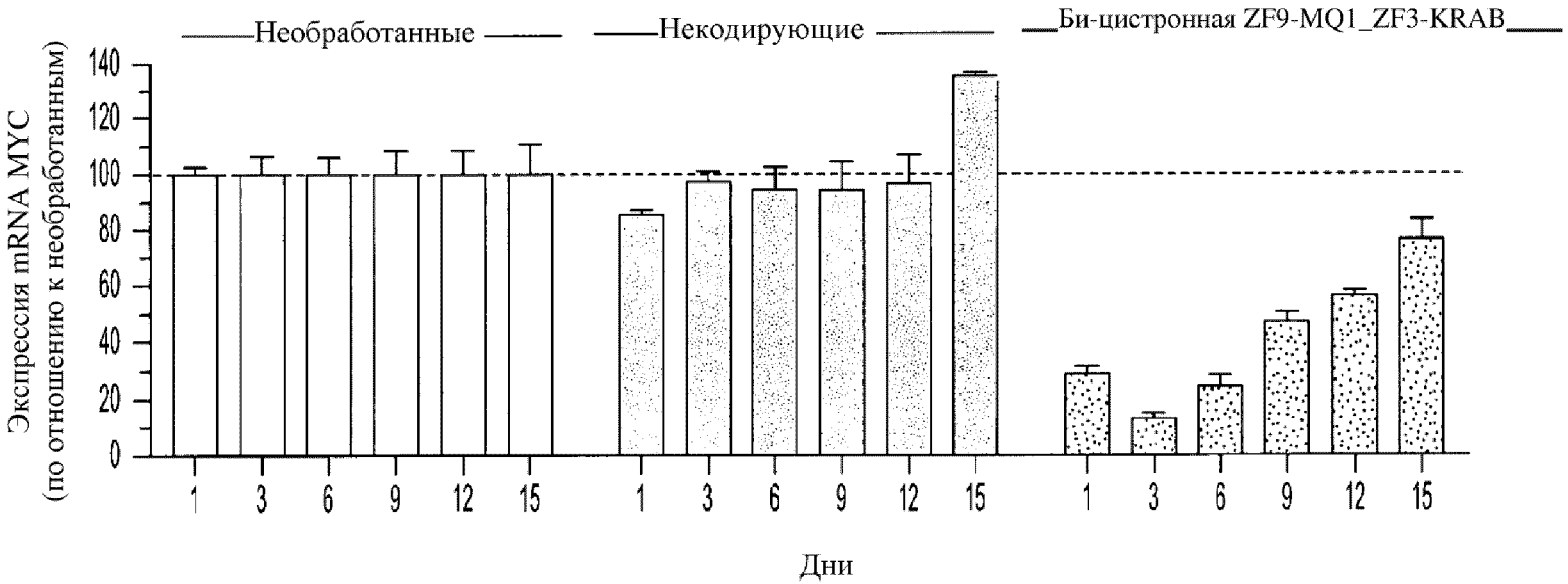

ФИГ. 34C

| Линия клеток | Подтип | Жизнеспособность ($EC_{50}$; мкг/мл) | mRNA MYC ($EC_{50}$; мкг/мл) |
|---|---|---|---|
| SKHEP1 | 1 | 0,20 | 0,002 |
| SNU-182 | 1 | 0,02 | <0,001 |
| SUN-449 | 1 | н. д. | <0,001 |
| Hep 3B | 2 | 0,12 | <0,001 |
| Hep G2 | 2 | 0,12 | 0,037 |

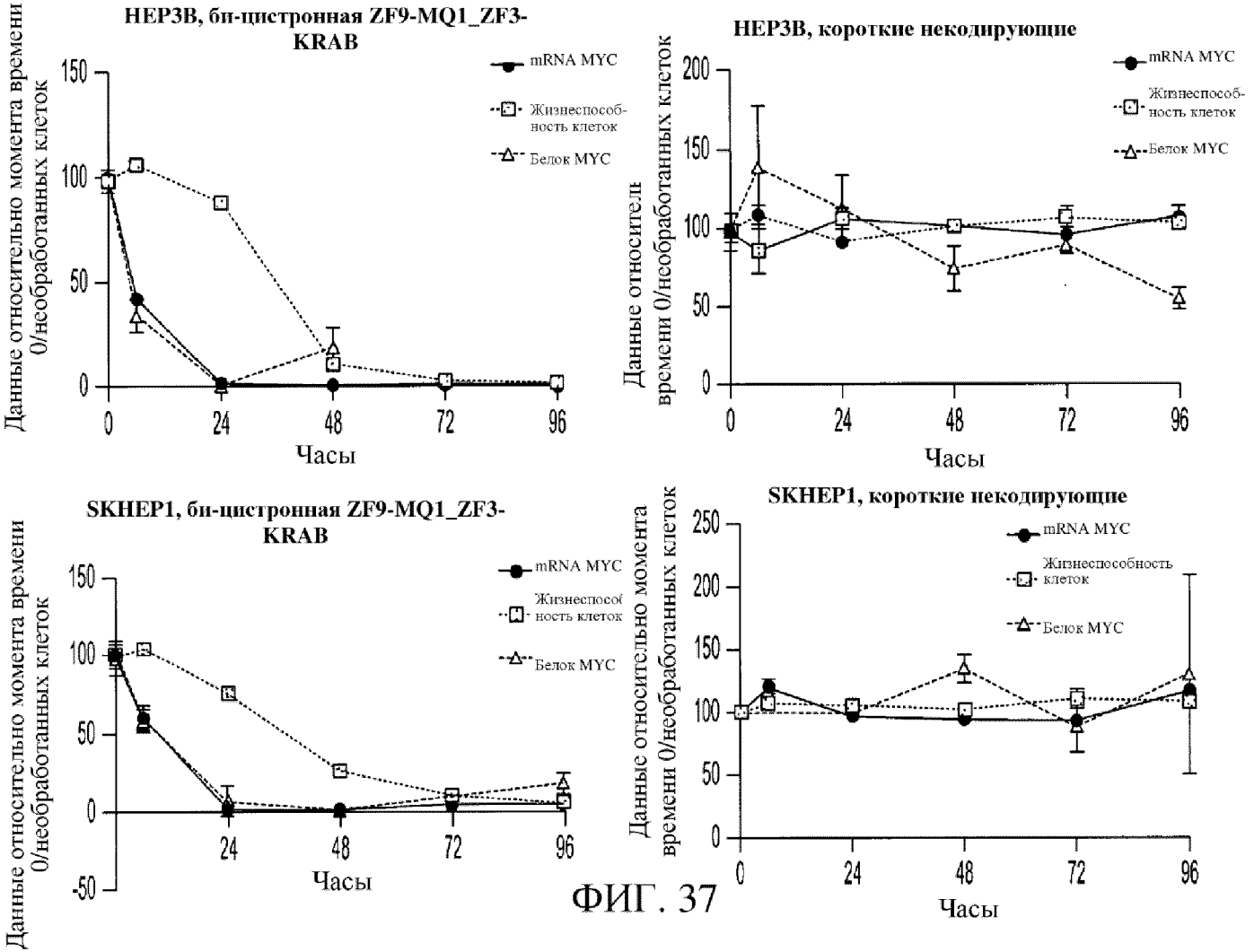
ФИГ. 34D


Гейтирование
Нер 3В
Апоптические клетки 20,6
Апоптические клетки 26,1
Апоптические клетки 75,2
Comp-V10-A
Comp-B12-A
PI
D3 необраотанные 3.fcs
Отдельные клетки
3243
D5 nc 2.fcs
Отдельные клетки
3043
D9 би-цистронная ZF9-MQ1_ZF3-KRAB 4.fcs
Отдельные клетки
2666
Смерть клеток HEP3B
Смерть клеток HEPG2
Смерть клеток SKHEP1
% апоптических клеток
Необработанные
Некодирующие
Би-цистронная ZF9-MQ1_ZF3-KRAB

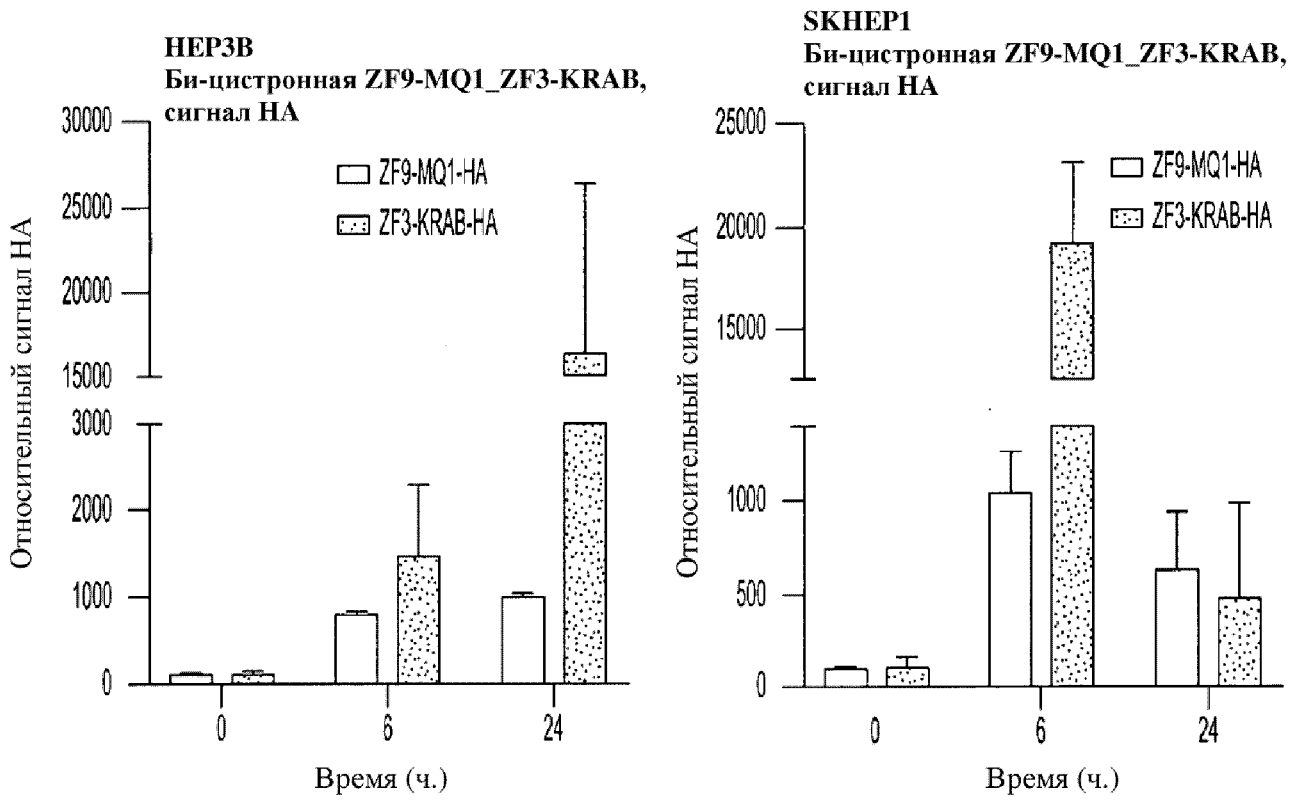
ФИГ. 35


mRNA MYC SKHEP1
Необработанные
Некодирующие
Би-цистронная ZF9-MQ1_ZF3-KRAB
Экспрессия mRNA MYC
(по отношению к необработанным)
140
120
100
80
60
40
20
0
1
3
6
9
12
15
Дни

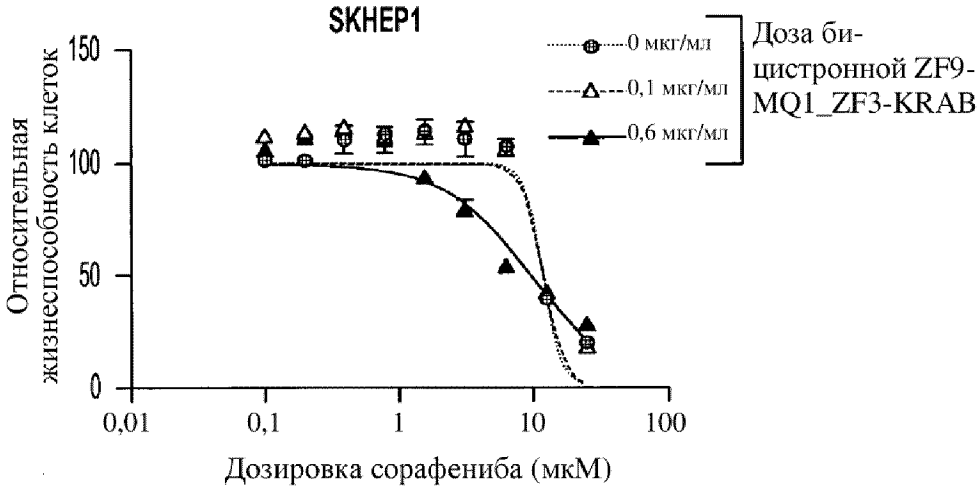
ФИГ. 36


HEP3B, би-цистронная ZF9-MQ1_ZF3-KRAB
mRNA MYC
Жизнеспособность клеток
Белок MYC
Данные относительно момента времени 0/необработанных клеток
Часы
HEP3B, короткие некодирующие
SKHEP1, би-цистронная ZF9-MQ1_ZF3-KRAB
SKHEP1, короткие некодирующие

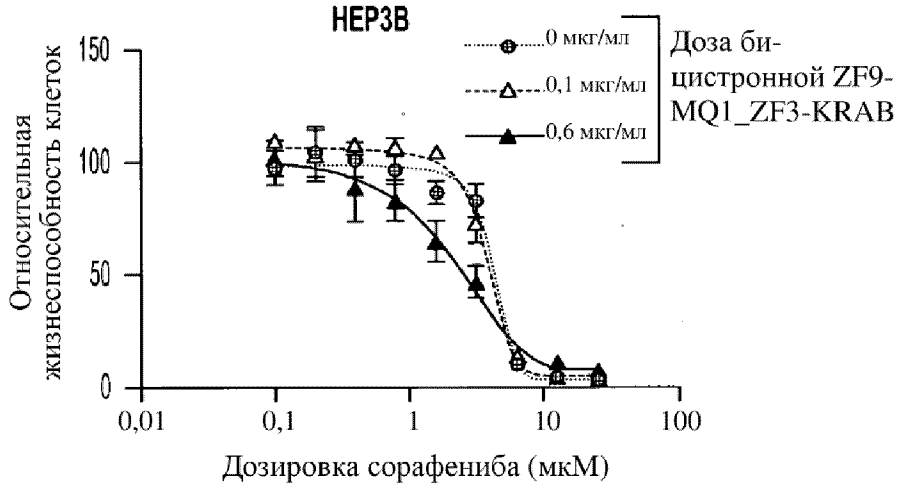
ФИГ. 37


HEP3B
Би-цистронная ZF9-MQ1_ZF3-KRAB, сигнал HA
ZF9-MQ1-HA
ZF3-KRAB-HA
Относительный сигнал HA
30000
25000
20000
15000
3000
2000
1000
0
0
6
24
Время (ч.)
SKHEP1
Би-цистронная ZF9-MQ1_ZF3-KRAB, сигнал HA
ZF9-MQ1-HA
ZF3-KRAB-HA
Относительный сигнал HA
25000
20000
15000
1000
500
0
0
6
24
Время (ч.)

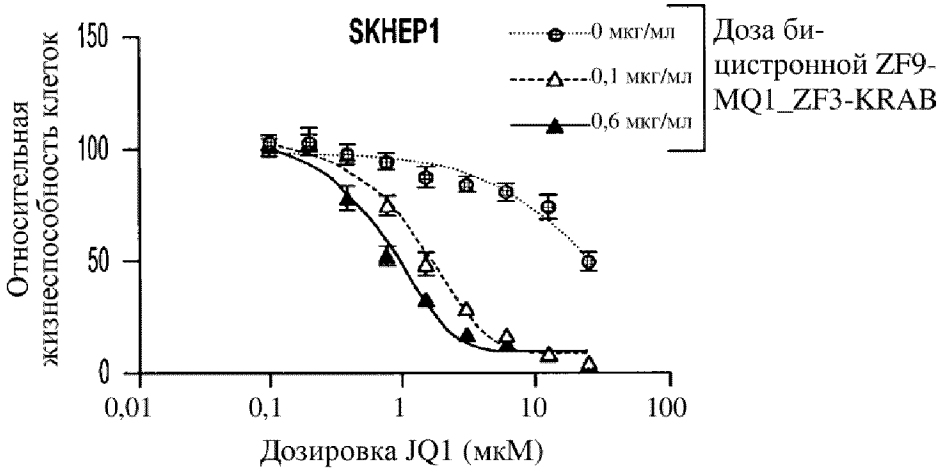
ФИГ. 38



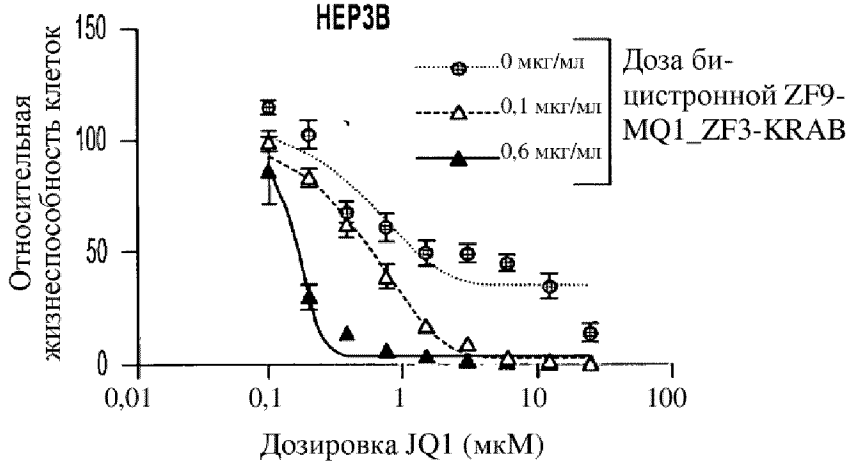

ФИГ. 39A



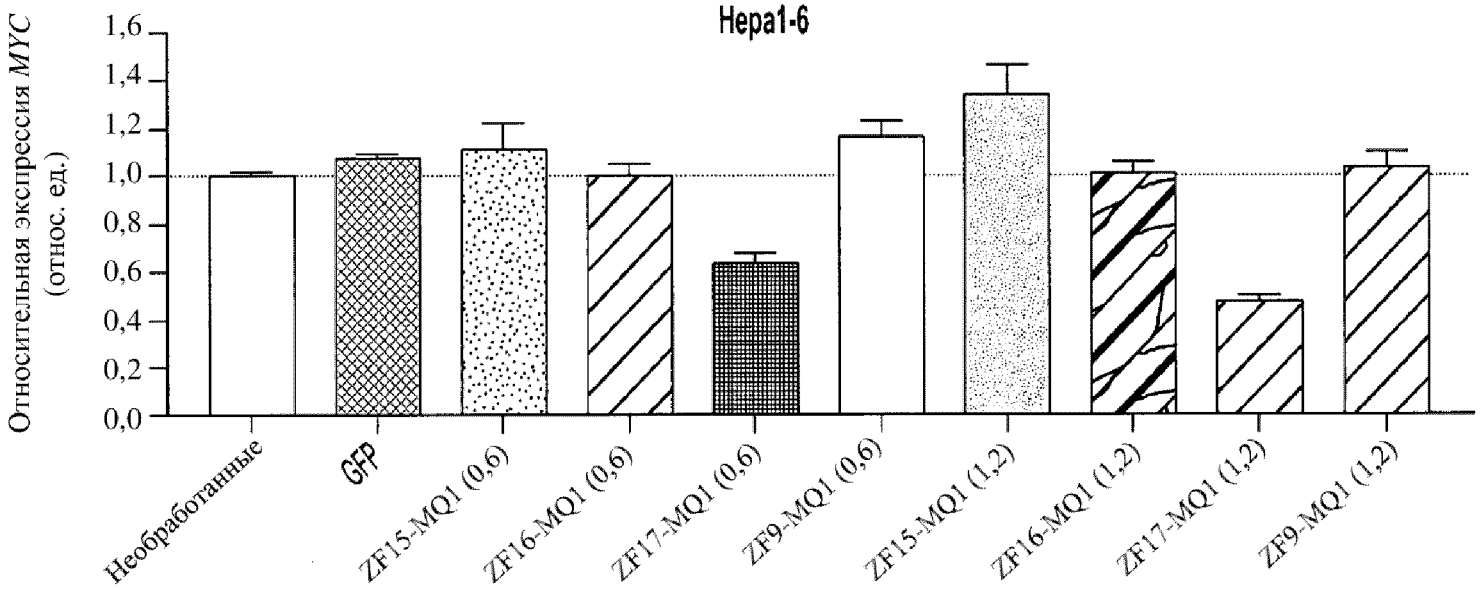

ФИГ. 39B



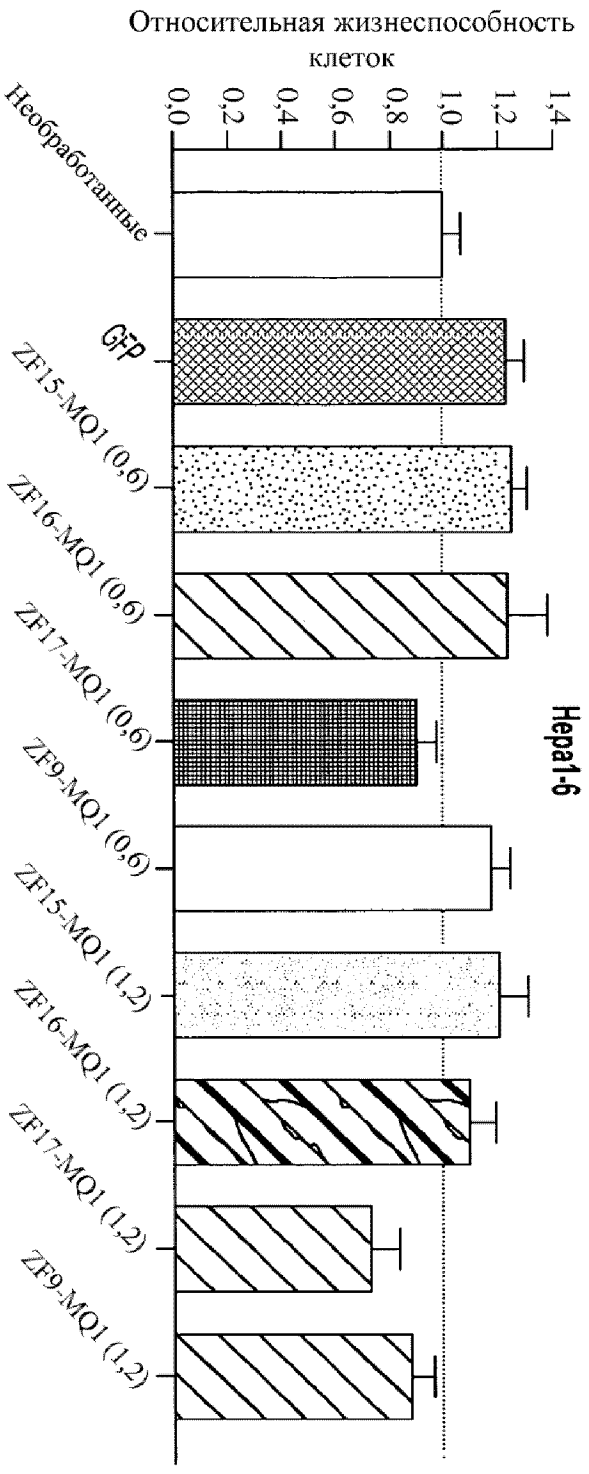

ФИГ. 40A



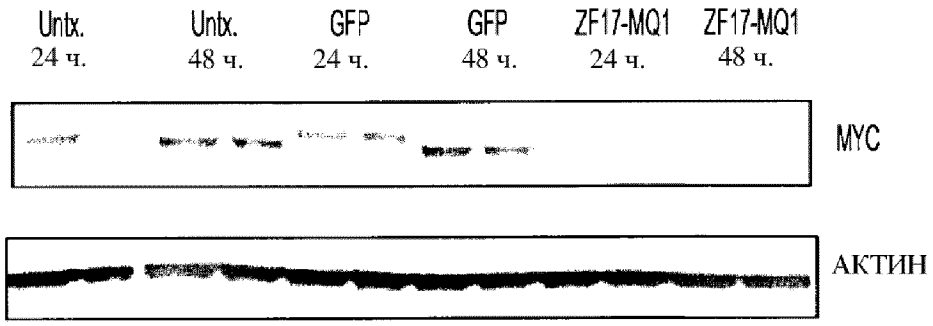

ФИГ. 40B


Hepa1-6
Относительная экспрессия MYC
(относ. ед.)
1,6
1,4
1,2
1,0
0,8
0,6
0,4
0,2
0,0
Необработанные
GFP
ZF15-MQ1 (0,6)
ZF16-MQ1 (0,6)
ZF17-MQ1 (0,6)
ZF9-MQ1 (0,6)
ZF15-MQ1 (1,2)
ZF16-MQ1 (1,2)
ZF17-MQ1 (1,2)
ZF9-MQ1 (1,2)

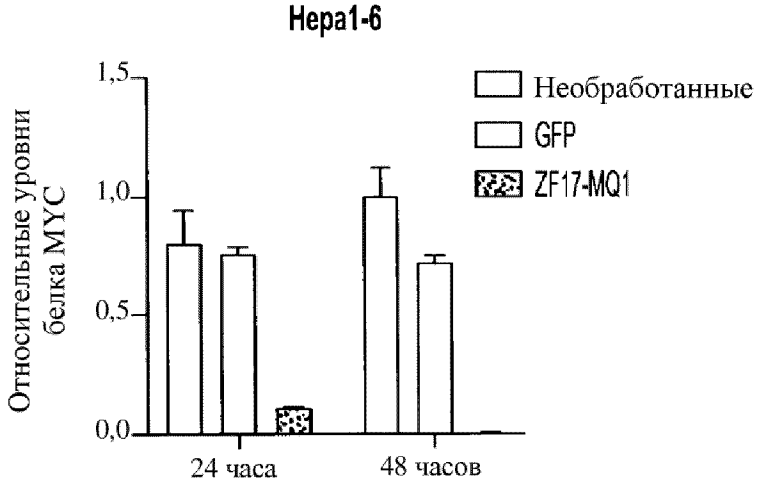
ФИГ. 41А


Относительная жизнеспособность клеток
0,0
0,2
0,4
0,6
0,8
1,0
1,2
1,4
Необработанные
GFP
ZF15-MQ1 (0,6)
ZF16-MQ1 (0,6)
ZF17-MQ1 (0,6)
ZF9-MQ1 (0,6)
ZF15-MQ1 (1,2)
ZF16-MQ1 (1,2)
ZF17-MQ1 (1,2)
ZF9-MQ1 (1,2)
Hepa1-6

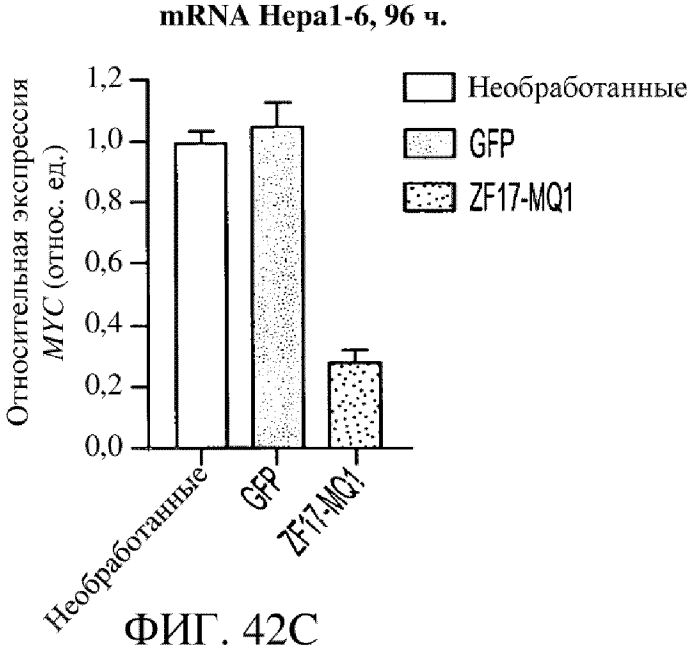
ФИГ. 41B



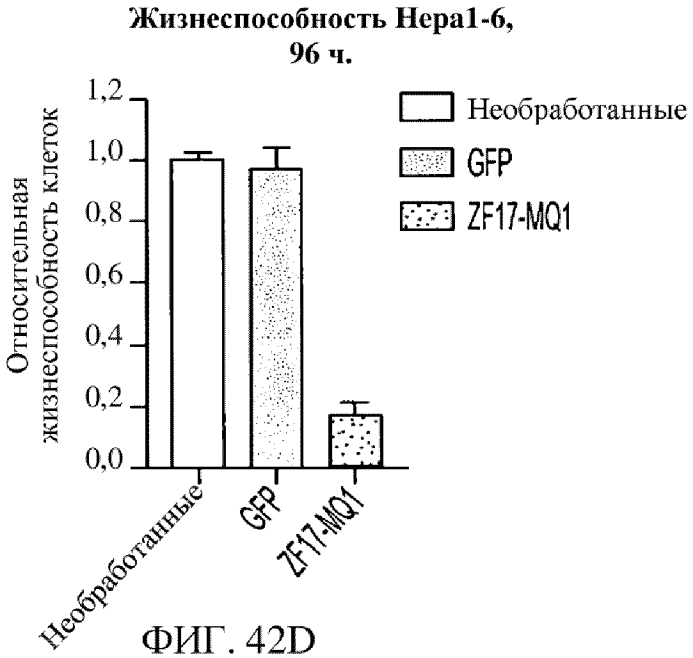

ФИГ. 42А



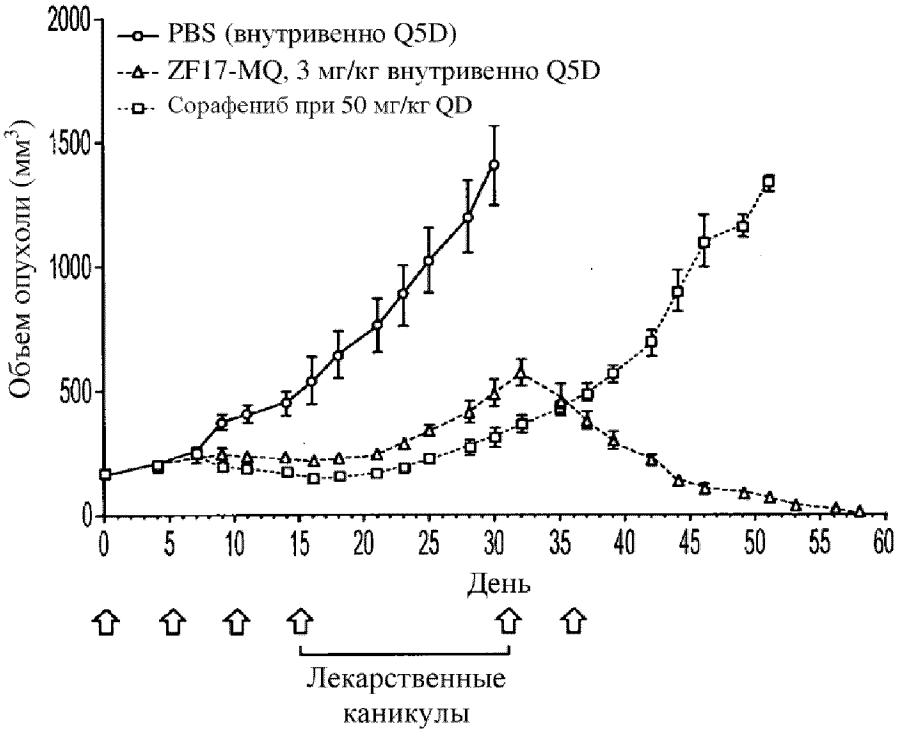

ФИГ. 42В



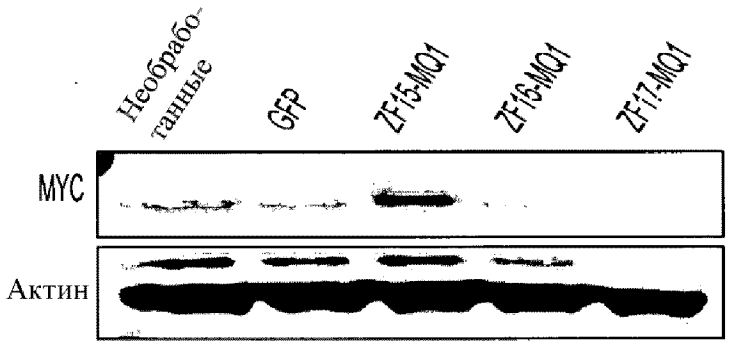

ФИГ. 42C



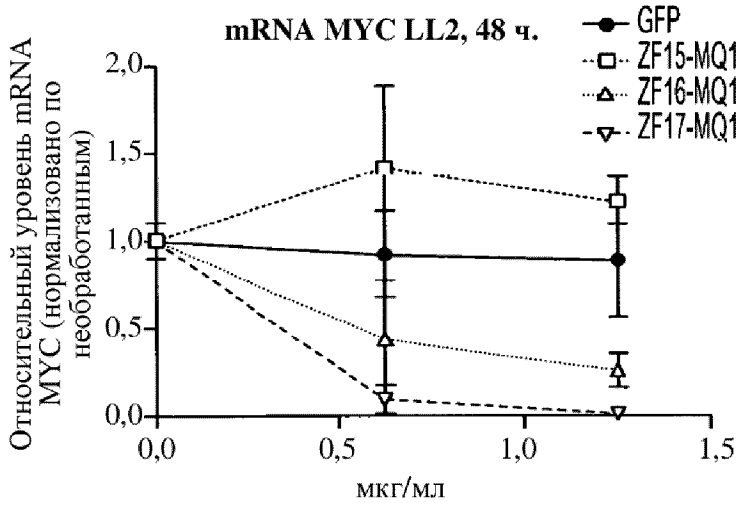

ФИГ. 42D


PBS (внутривенно Q5D)
ZF17-MQ, 3 мг/кг внутривенно Q5D
Сорафениб при 50 мг/кг QD
Объем опухоли (мм3)
2000
1500
1000
500
0
0
5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
День
Лекарственные
каникулы

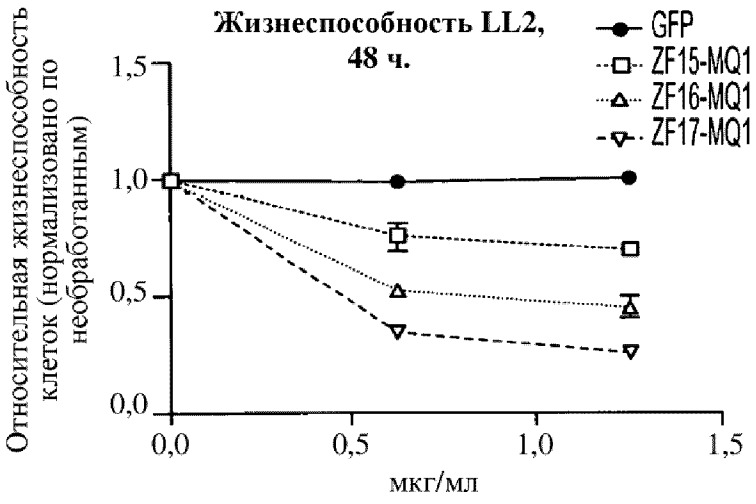
ФИГ. 43



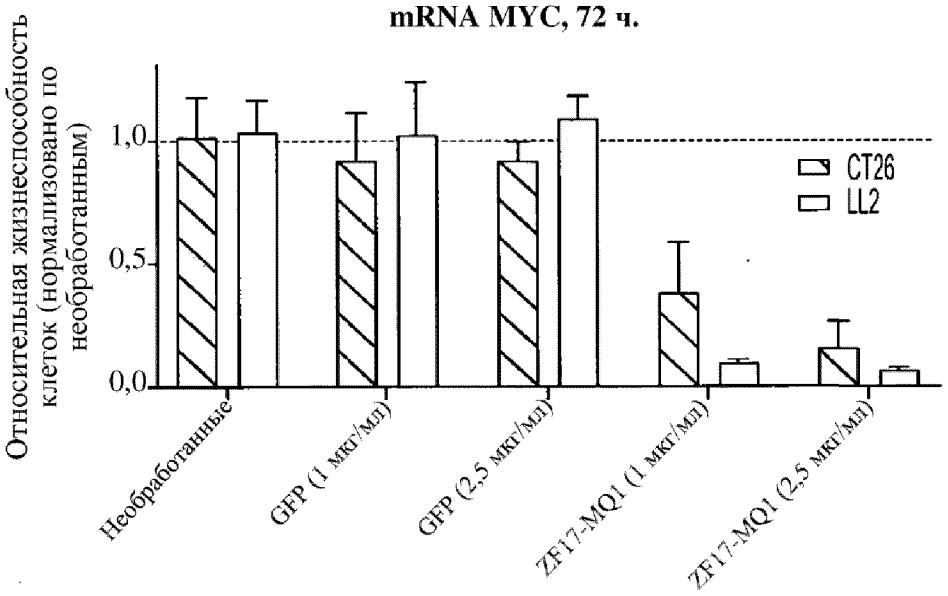

ФИГ. 44A



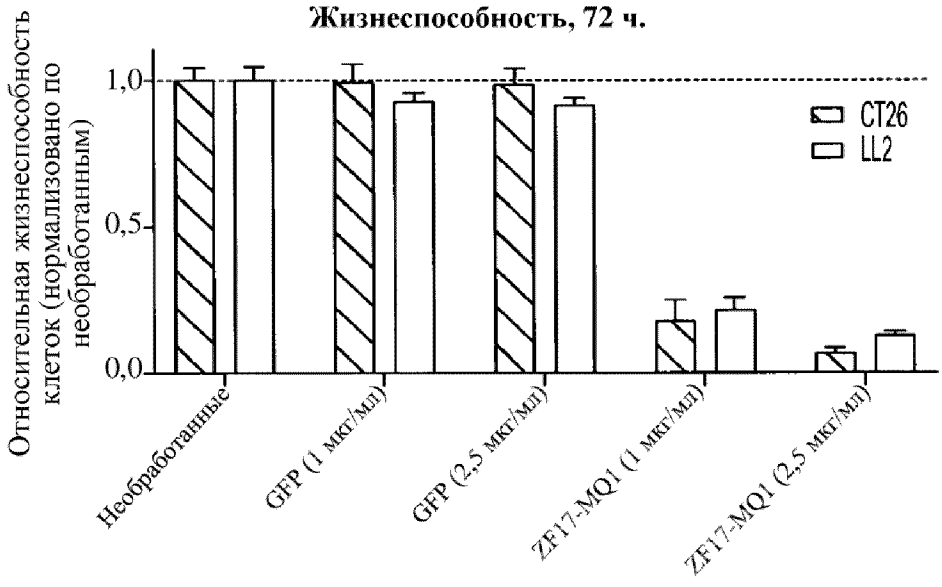

ФИГ. 44B



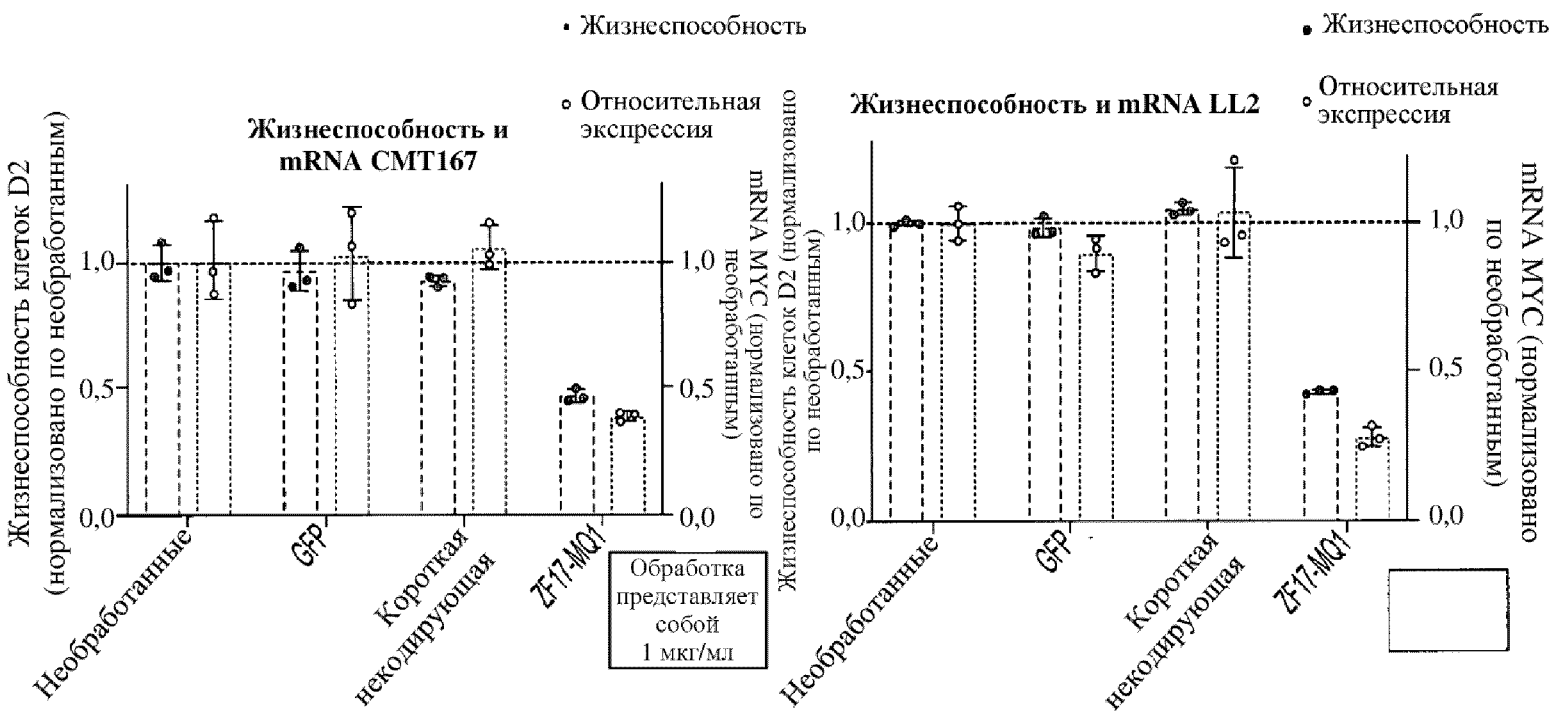

ФИГ. 44C



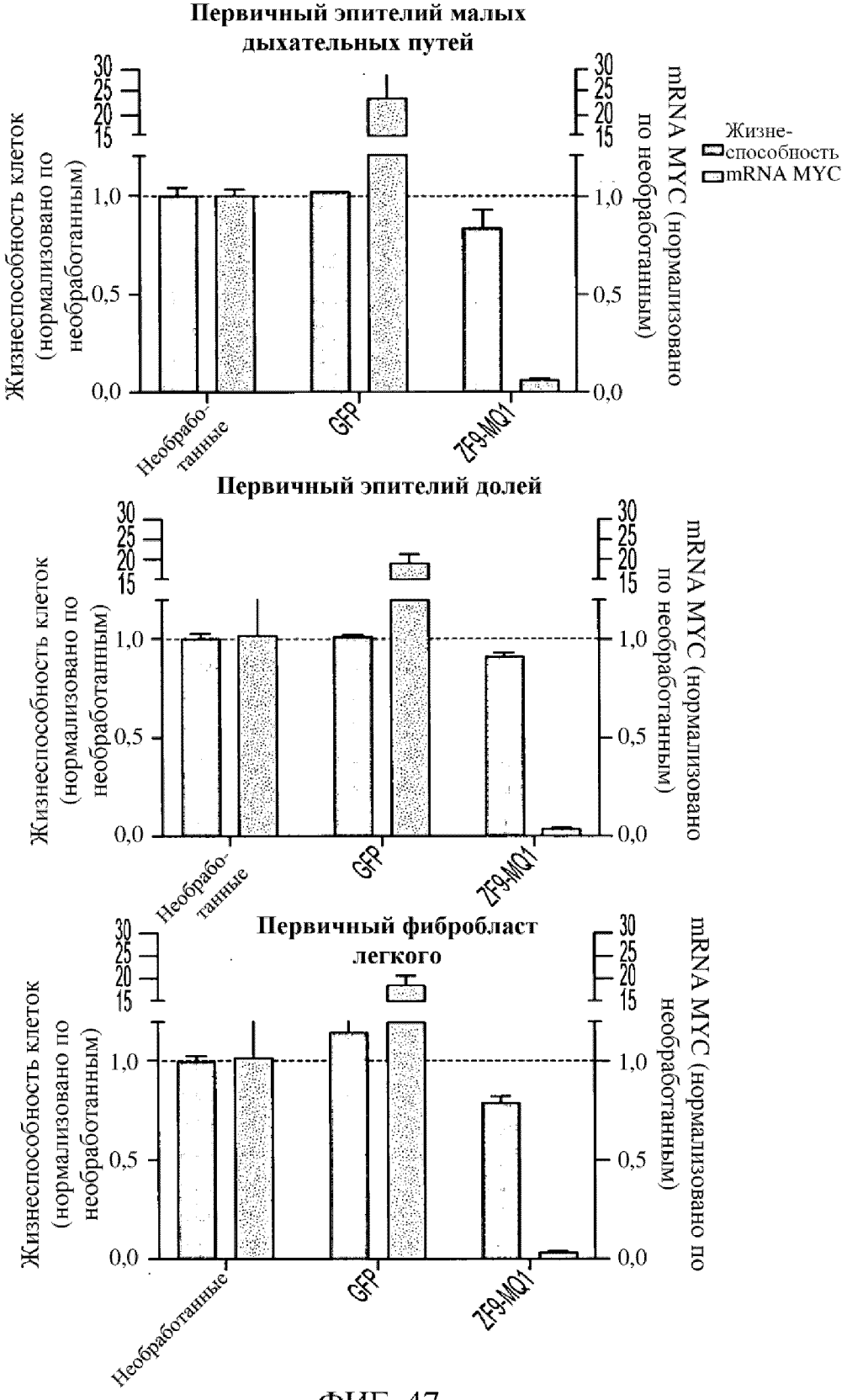

ФИГ. 45A



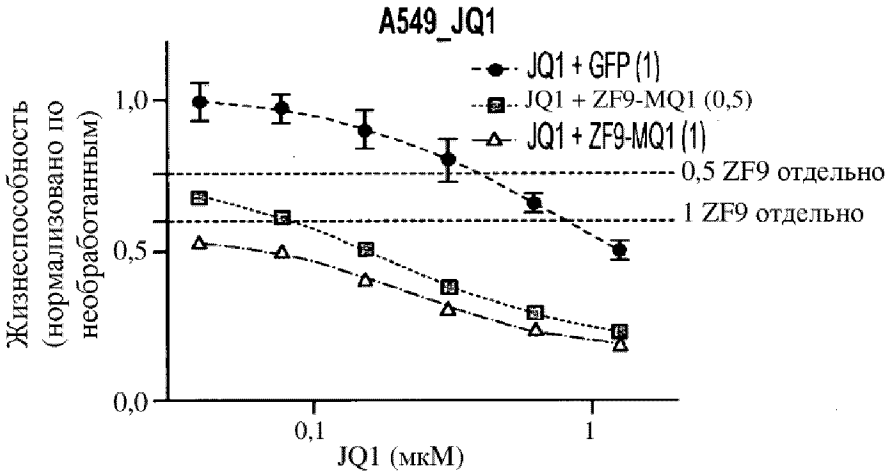

ФИГ. 45B


Жизнеспособность
Относительная экспрессия
Жизнеспособность и mRNA CMT167
Жизнеспособность клеток D2 (нормализовано по необработанным)
mRNA MYC (нормализовано по необработанным)
1,0
0,5
0,0
Необработанные
GFP
Короткая некодирующая
ZF17-MQ1
Обработка представляет собой 1 мкг/мл
Жизнеспособность
Относительная экспрессия
Жизнеспособность и mRNA LL2
Жизнеспособность клеток D2 (нормализовано по необработанным)
mRNA MYC (нормализовано по необработанным)
1,0
0,5
0,0
Необработанные
GFP
Короткая некодирующая
ZF17-MQ1

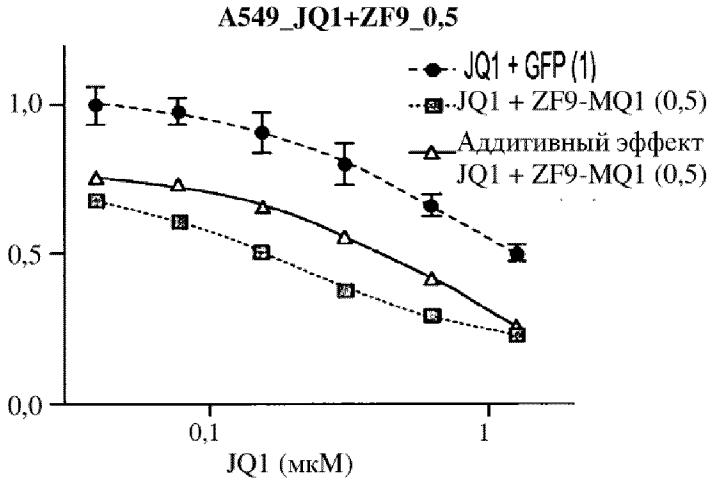
ФИГ. 46


Первичный эпителий малых дыхательных путей
Жизнеспособность клеток (нормализовано по необработанным)
mRNA MYC (нормализовано по необработанным)
Жизне-способность
mRNA MYC
30
25
20
15
1,0
0,5
0,0
Необрабо-танные
GFP
ZF9-MQ1
Первичный эпителий долей
Жизнеспособность клеток (нормализовано по необработанным)
mRNA MYC (нормализовано по необработанным)
Необрабо-танные
GFP
ZF9-MQ1
Первичный фибробласт легкого
Жизнеспособность клеток (нормализовано по необработанным)
mRNA MYC (нормализовано по необработанным)
Необработанные
GFP
ZF9-MQ1

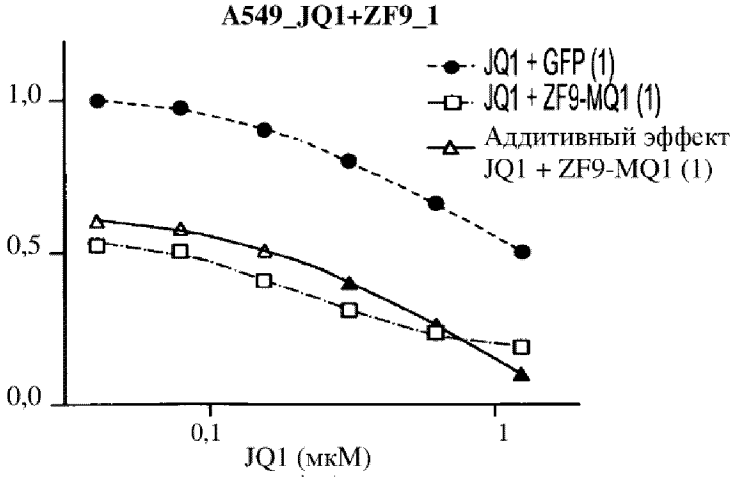
ФИГ. 47



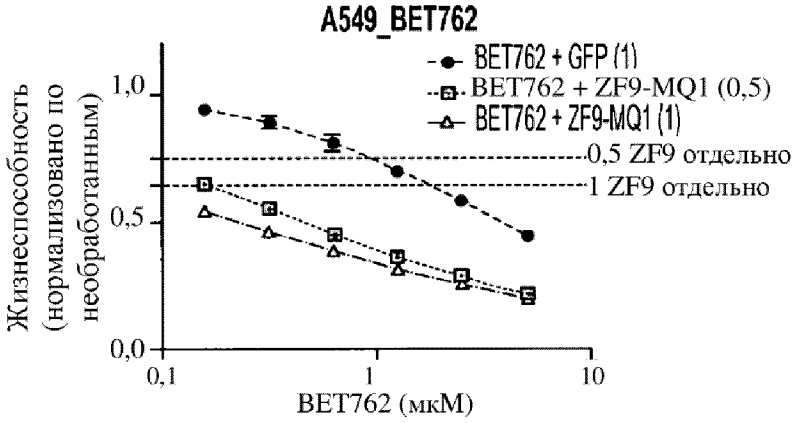

ФИГ. 48A



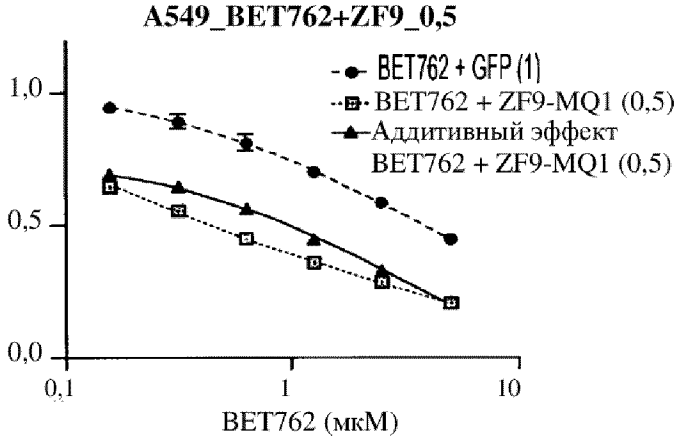

ФИГ. 48B



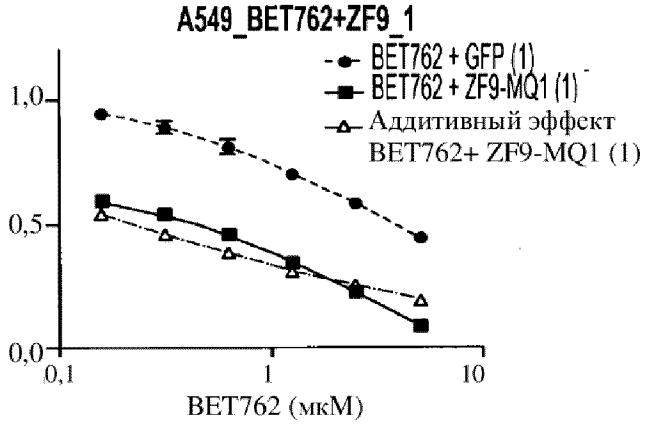

ФИГ. 48C



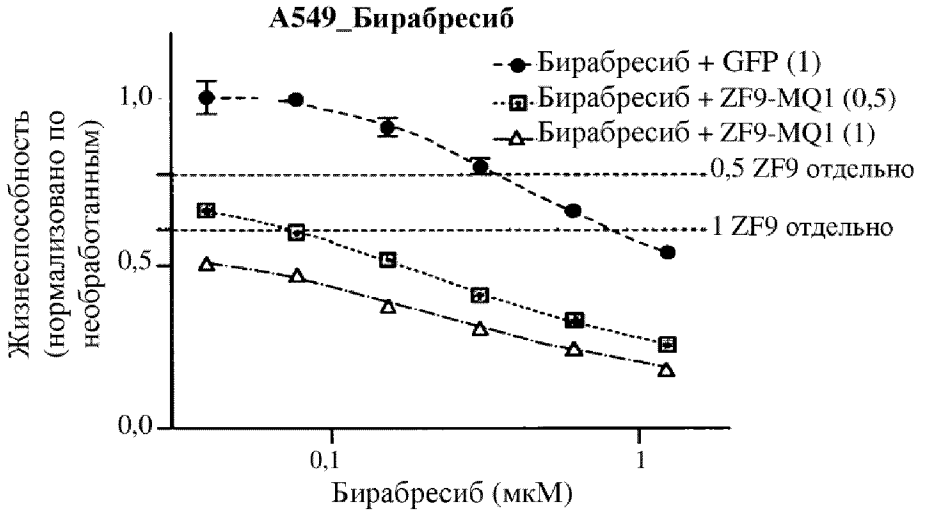

ФИГ. 49A



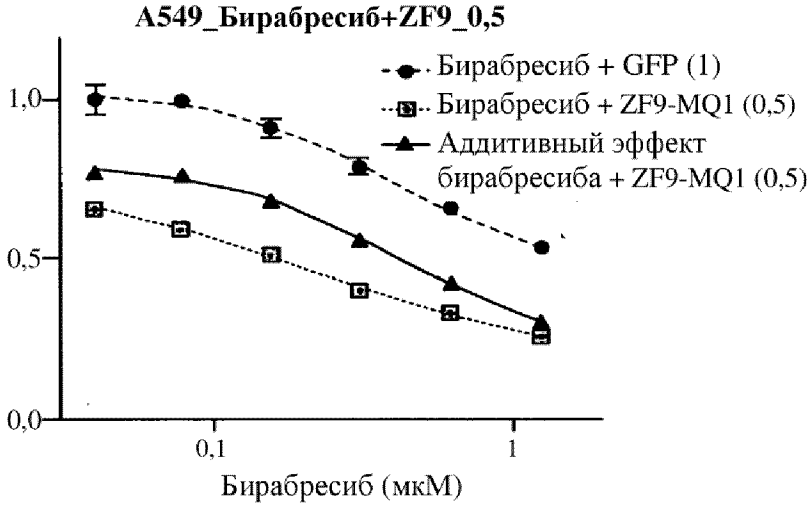

ФИГ. 49B



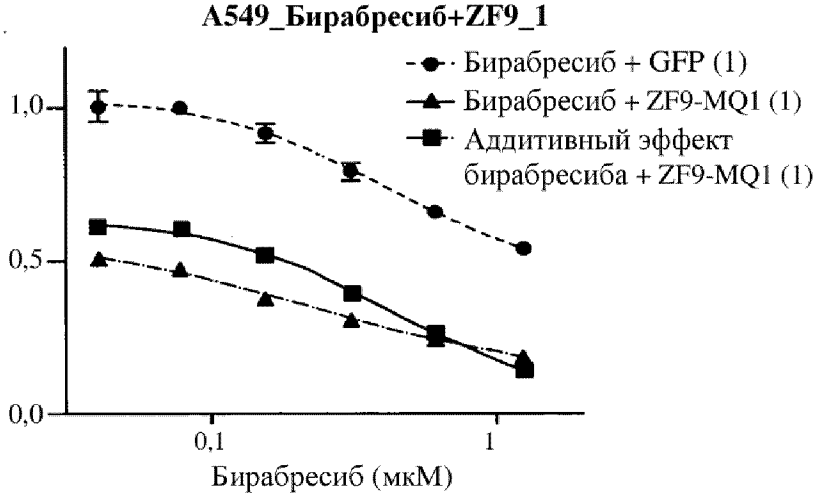

ФИГ. 49C



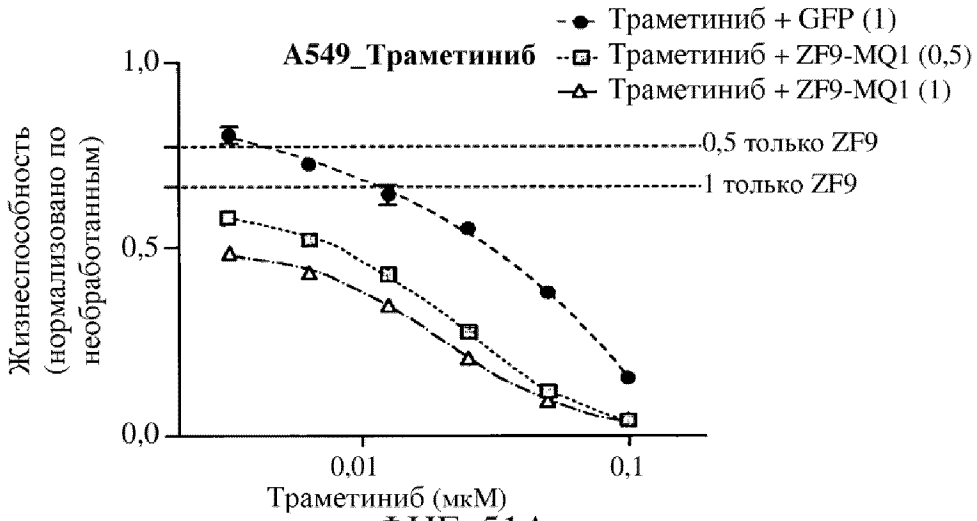

ФИГ. 50A



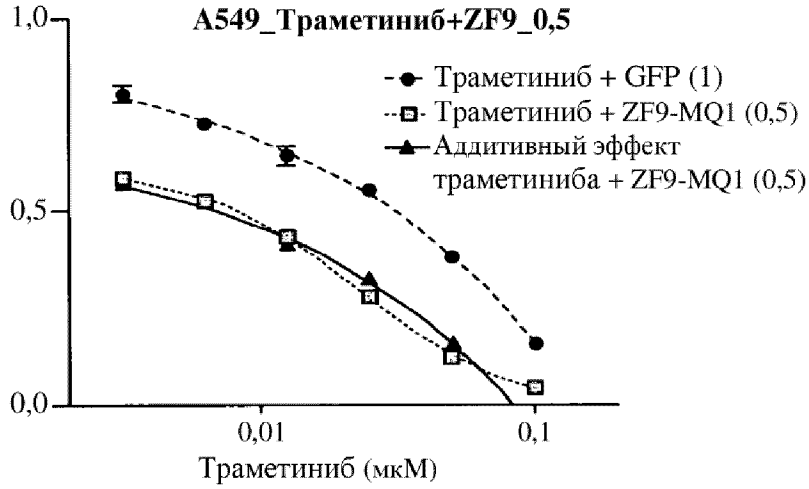

ФИГ. 50B



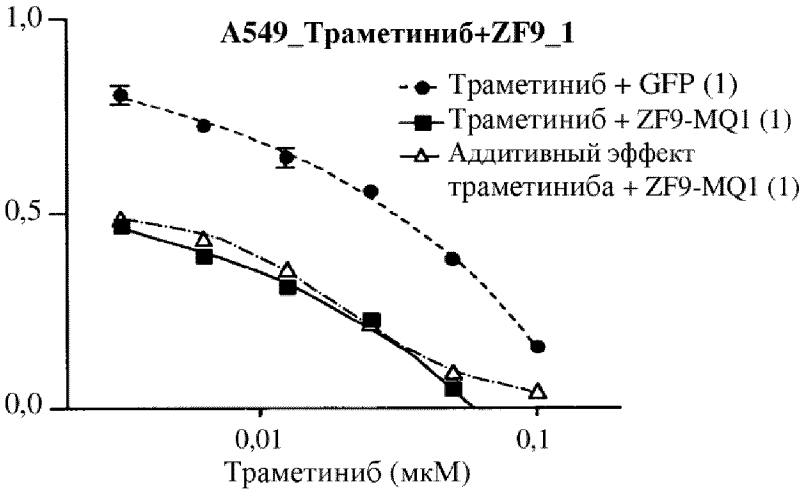

ФИГ. 50C



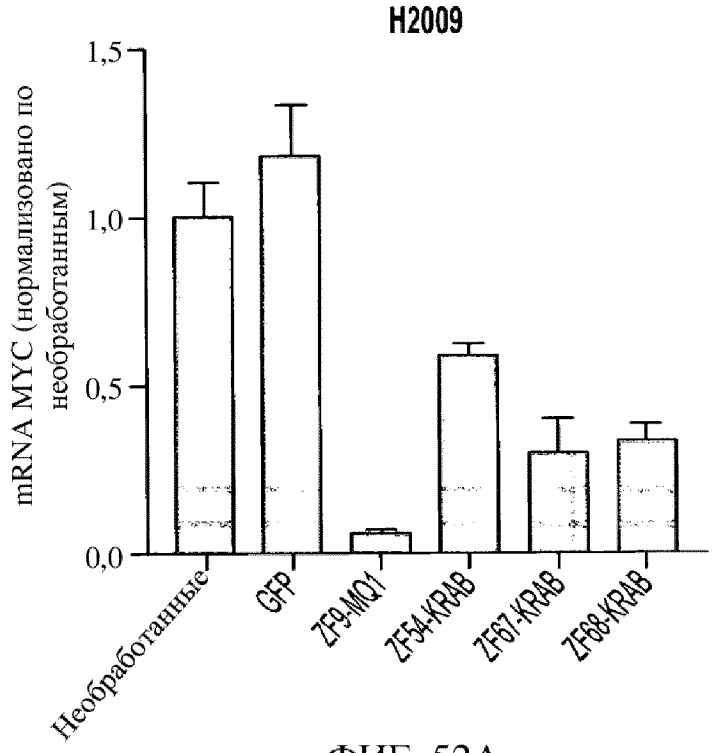

ФИГ. 51A



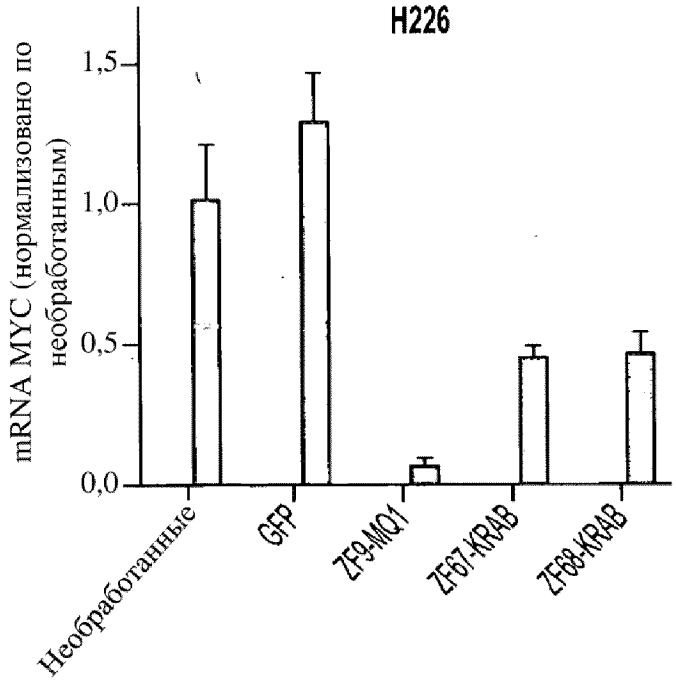

ФИГ. 51B



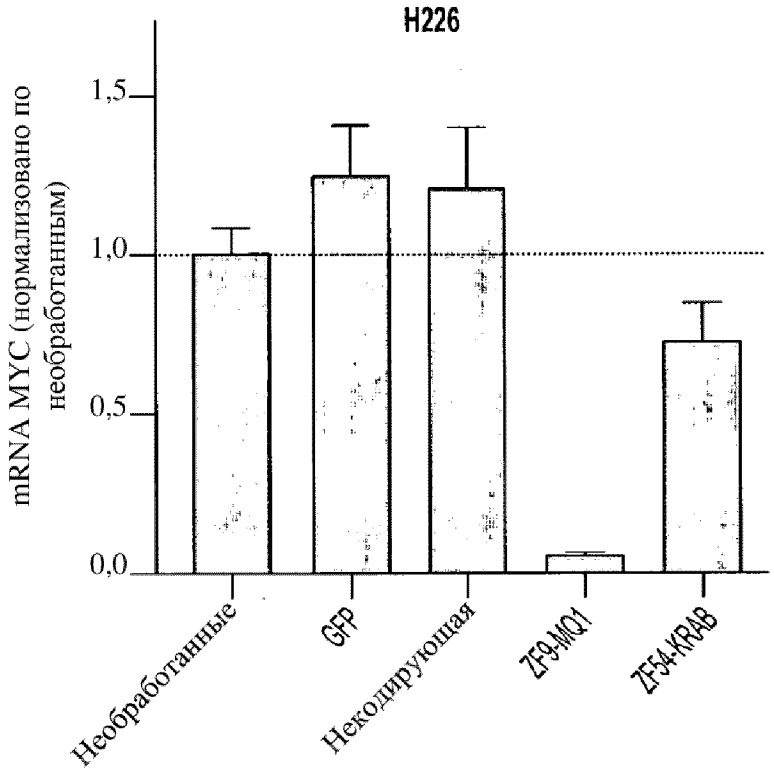

ФИГ. 51C



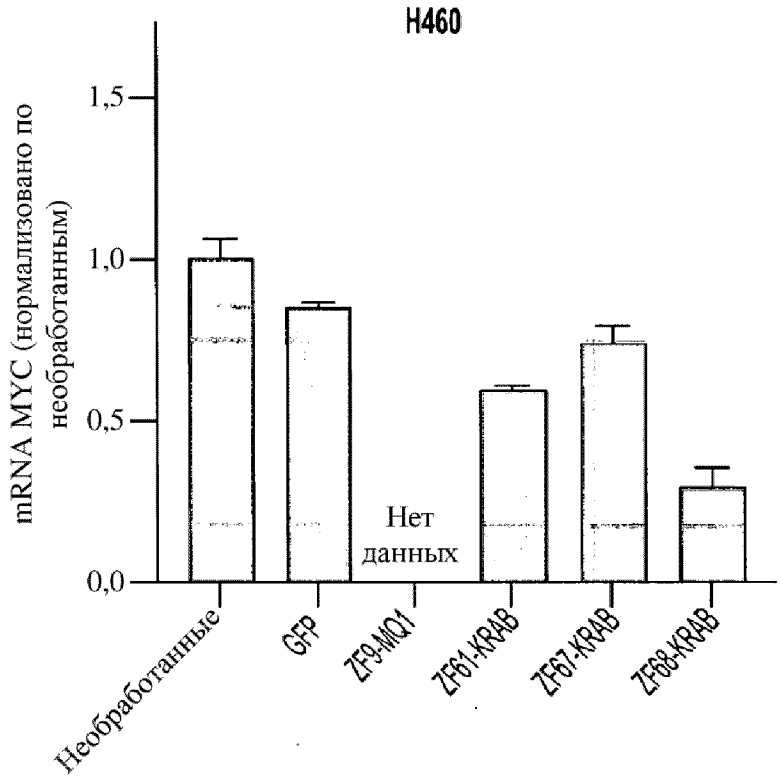

ФИГ. 52А



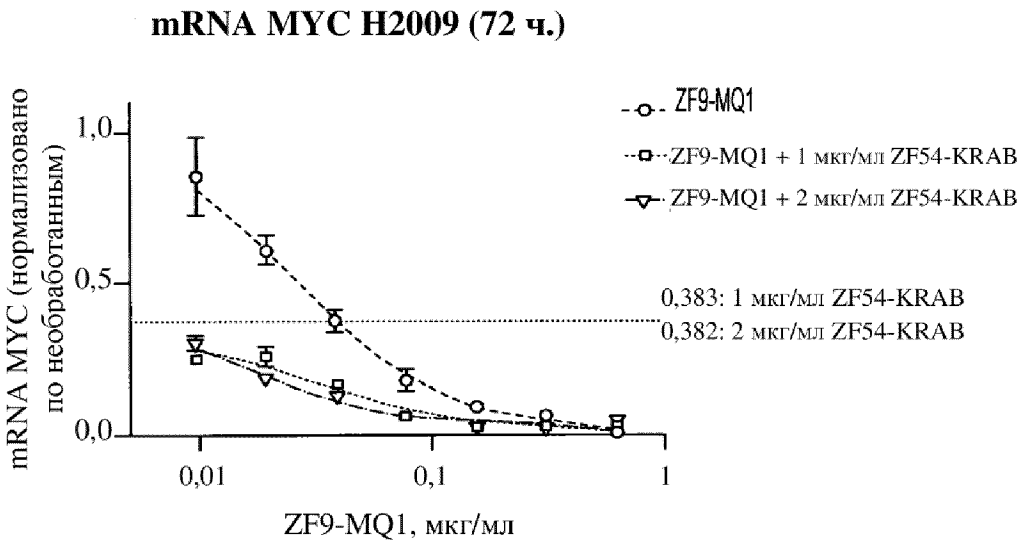

ФИГ. 52В


H226
mRNA MYC (нормализовано по необработанным)
1,5
1,0
0,5
0,0
Необработанные
GFP
Некодирующая
ZF9-MO1
ZF54-KRAB

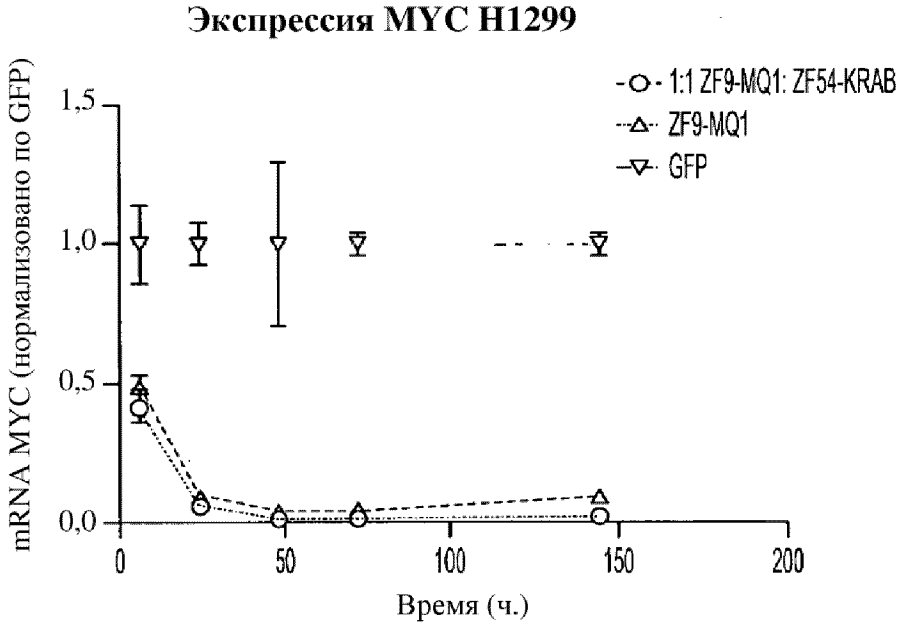
ФИГ. 52С


H460
mRNA MYC (нормализовано по необработанным)
1,5
1,0
0,5
0,0
Нет данных
Необработанные
GFP
ZF9-MQ1
ZF61-KRAB
ZF67-KRAB
ZF68-KRAB

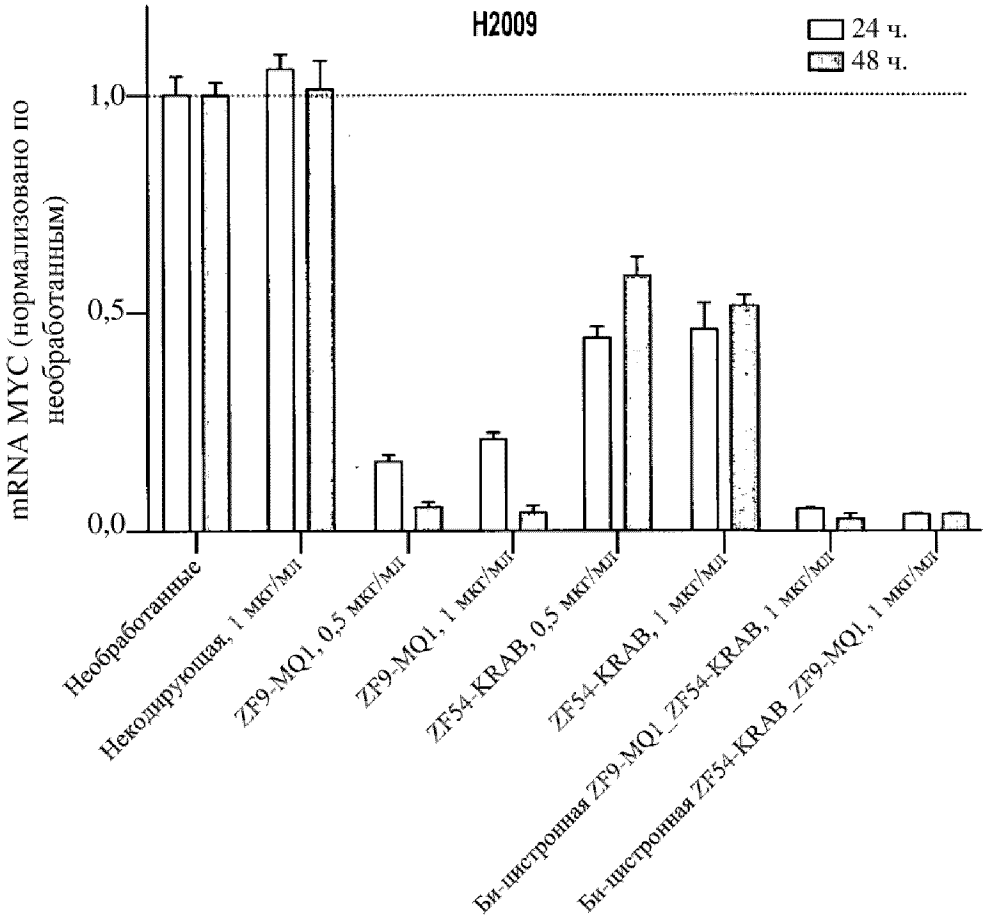
ФИГ. 52D


mRNA MYC H2009 (72 ч.)
mRNA MYC (нормализовано по необработанным)
1,0
0,5
0,0
0,01
0,1
1
ZF9-MQ1, мкг/мл
ZF9-MQ1
ZF9-MQ1 + 1 мкг/мл ZF54-KRAB
ZF9-MQ1 + 2 мкг/мл ZF54-KRAB
0,383: 1 мкг/мл ZF54-KRAB
0,382: 2 мкг/мл ZF54-KRAB

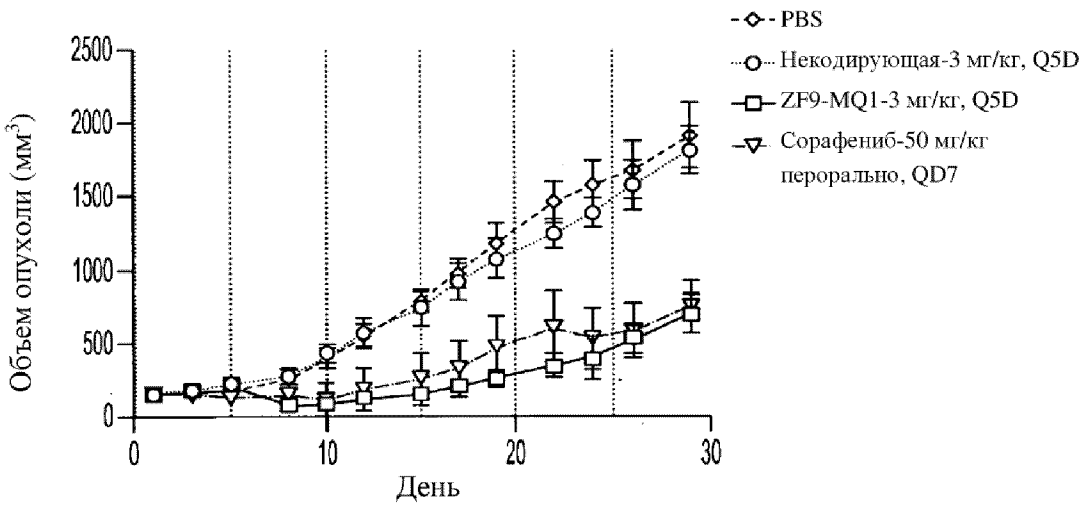
ФИГ. 53


Экспрессия MYC H1299
mRNA MYC (нормализовано по GFP)
1,5
1,0
0,5
0,0
0
50
100
150
200
Время (ч.)
1:1 ZF9-MQ1: ZF54-KRAB
ZF9-MQ1
GFP

ФИГ. 54


H2009
24 ч.
48 ч.
mRNA MYC (нормализовано по необработанным)
1,0
0,5
0,0
Необработанные
Неколирующая, 1 мкг/мл
ZF9-MQ1, 0,5 мкг/мл
ZF9-MQ1, 1 мкг/мл
ZF54-KRAB, 0,5 мкг/мл
ZF54-KRAB, 1 мкг/мл
Би-цистронная ZF9-MQ1_ZF54-KRAB, 1 мкг/мл
Би-цистронная ZF54-KRAB_ZF9-MQ1, 1 мкг/мл

ФИГ. 55


PBS
Некодирующая-3 мг/кг, Q5D
ZF9-MQ1-3 мг/кг, Q5D
Сорафениб-50 мг/кг перорально, QD7
Объем опухоли (мм3)
2500
2000
1500
1000
500
0
0
10
20
30
День

ФИГ. 56