(19) Евразийское патентное ведомство

(21) 202391838 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.11.07

(22) Дата подачи заявки
2021.12.22

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

(54) КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ МОДИФИКАЦИИ CIITA В КЛЕТКЕ

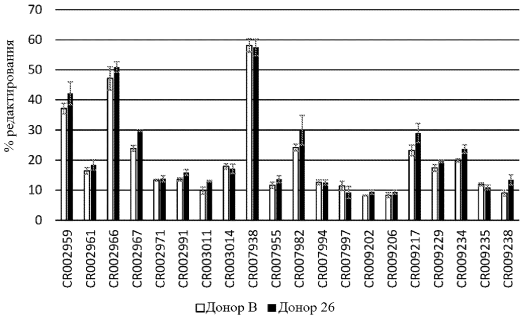
(31) **63/130,098; 63/251,002; 63/254,971; 63/288,502**
(32) **2020.12.23; 2021.09.30; 2021.10.12; 2021.12.10**
(33) **US**
(86) **PCT/US2021/064933**
(87) **WO 2022/140587 2022.06.30**

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

(72) Изобретатель:
Харрингтон Уилльям Фредерик, Гоел Сурбхи (US)

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

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



202391838 A1

202391838 A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-578533EA/061

КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ МОДИФИКАЦИИ CIITA В КЛЕТКЕ

[0001] Данная заявка заявляет приоритет в соответствии с 35 U.S.C. 119(e) предварительной заявки США № 63/130 098, поданной 23 декабря 2020 года, предварительной заявки США № 63/251 002, поданной 30 сентября 2021 года, предварительной заявки США № 63/254 971, поданной 12 октября 2021 года, и предварительной заявки США № 63/288 502, поданной 10 декабря 2021 года; при этом каждая из этих заявок включена в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

[0002] Данная заявка подана совместно с Перечнем последовательностей в электронном формате. Перечень последовательностей представлен в виде файла под названием «2021-12-20_01155-0038-00PCT_Seq_List_ST25.txt», созданного 20 декабря 2021 г. и имеющего размер 410 044 байт. Информация в электронном формате перечня последовательностей в полном объеме включена в данный документ посредством ссылки.

ВВЕДЕНИЕ И КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

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

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

[0005] Незначительные различия, *например*, в аллелях MHC между индивидуумами, могут вызвать активацию Т-клеток у реципиента. Во время развития Т-клеток, репертуар Т-клеток индивидуума толерантен к собственным молекулам MHC, но Т-клетки, которые распознают молекулы MHC другого индивидуума, могут сохраняться в кровотоке и называются аллореактивными Т-клетками. Аллореактивные Т-клетки могут активироваться, *например*, при наличии в организме клеток другого индивидуума, экспрессирующих молекулы MHC, вызывая, *например*, болезнь «трансплантат против хозяина» и отторжение трансплантата.

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

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

[0008] Данное изобретение предлагает сконструированные клетки со сниженной или устраненной поверхностной экспрессией MHC класса II. Сконструированная клетка содержит генетическую модификацию гена CIITA (трансактиватор главного комплекса гистосовместимости класса II), который может быть полезен в клеточной терапии. В описании дополнительно представлены композиции и способы для снижения или устранения поверхностной экспрессии белка MHC класса II в клетке путем генетической модификации гена CIITA. Белок CIITA действует как активатор транскрипции (активируя промотор MHC класса II) и необходим для экспрессии белка MHC класса II.

[0009] В некоторых вариантах осуществления в данном изобретении также предложены композиции и способы для снижения или устранения поверхностной экспрессии белка MHC класса I в клетке, например, путем генетической модификации B2M (β-2-микроглобулина) или путем генетической модификации гена HLA-A. Белок B2M образует гетеродимер с молекулами MHC класса I и необходим для экспрессии белка

MHC класса I на клеточной поверхности. В некоторых вариантах осуществления, включающих генетическую модификацию B2M, изобретение дополнительно обеспечивает экспрессию молекулы ингибитора NK-клеток клеткой для снижения или устранения литической активности NK-клеток. В некоторых вариантах осуществления в изобретении дополнительно предложены композиции и способы для снижения или устранения поверхностной экспрессии HLA-A в клетках, гомозиготных по HLA-B и гомозиготных по HLA-C.

[0010] В некоторых вариантах осуществления способы и композиции дополнительно предусматривают вставку экзогенной нуклеиновой кислоты, *например*, кодирующей нацеливающий рецептор, другой полипептид, экспрессируемый на клеточной поверхности, или полипептид, который секретируется из клетки. В некоторых вариантах осуществления сконструированная клетка используется в качестве «клеточной фабрики» для секреции экзогенного белка у реципиента. В некоторых вариантах осуществления сконструированная клетка используется в качестве адоптивной клеточной терапии.

[0011] В данном документе предложена сконструированная клетка, в которой снижена или устранена поверхностная экспрессия MHC класса II по сравнению с немодифицированной клеткой, содержащая генетическую модификацию в гене CIITA, при этом генетическая модификация включает по меньшей мере один нуклеотид экзона в пределах геномных координат chr16:10902662-chr16:10923285.

[0012] В данном документе предложена сконструированная клетка, в которой снижена или устранена поверхностная экспрессия MHC класса II по сравнению с немодифицированной клеткой, содержащая генетическую модификацию в гене CIITA, при этом генетическая модификация включает индел, замену C на T или замену A на G в пределах геномных координат выбранных из: chr16:10902662-10902682, chr16:10902723-10902743, chr16:10902729-10902749, chr16:10903747-10903767, chr16:10903824-10903844, chr16:10903824-10903844, chr16:10903848-10903868, chr16:10904761-10904781, chr16:10904764-10904784, chr16:10904765-10904785, chr16:10904785-10904805, chr16:10906542-10906562, chr16:10906556-10906576, chr16:10906609-10906629, chr16:10906610-10906630, chr16:10906616-10906636, chr16:10906682-10906702, chr16:10906756-10906776, chr16:10906757-10906777, chr16:10906757-10906777, chr16:10906821-10906841, chr16:10906823-10906843, chr16:10906847-10906867, chr16:10906848-10906868, chr16:10906853-10906873, chr16:10906904-10906924, chr16:10906907-10906927, chr16:10906913-10906933, chr16:10906968-10906988, chr16:10906970-10906990, chr16:10906985-10907005, chr16:10907030-10907050, chr16:10907058-10907078, chr16:10907119-10907139, chr16:10907139-10907159, chr16:10907172-10907192, chr16:10907272-10907292, chr16:10907288-10907308, chr16:10907314-10907334, chr16:10907315-10907335, chr16:10907325-10907345, chr16:10907363-10907383, chr16:10907384-10907404, chr16:10907385-10907405, chr16:10907433-10907453, chr16:10907434-10907454, chr16:10907435-10907455,

chr16:10907441-10907461, chr16:10907454-10907474, chr16:10907461-10907481, chr16:10907476-10907496, chr16:10907539-10907559, chr16:10907586-10907606, chr16:10907589-10907609, chr16:10907621-10907641, chr16:10907622-10907642, chr16:10907623-10907643, chr16:10907730-10907750, chr16:10907731-10907751, chr16:10907757-10907777, chr16:10907781-10907801, chr16:10907787-10907807, chr16:10907790-10907810, chr16:10907810-10907830, chr16:10907820-10907840, chr16:10907870-10907890, chr16:10907886-10907906, chr16:10907924-10907944, chr16:10907928-10907948, chr16:10907932-10907952, chr16:10907935-10907955, chr16:10907978-10907998, chr16:10907979-10907999, chr16:10908069-10908089, chr16:10908073-10908093, chr16:10908101-10908121, chr16:10909056-10909076, chr16:10909138-10909158, chr16:10910195-10910215, chr16:10910196-10910216, chr16:10915592-10915612, chr16:10915626-10915646, chr16:10916375-10916395, chr16:10916382-10916402, chr16:10916426-10916446, chr16:10916432-10916452, chr16:10918486-10918506, chr16:10918492-10918512, chr16:10918493-10918513, chr16:10922435-10922455, chr16:10922441-10922461, chr16:10922441-10922461, chr16:10922444-10922464, chr16:10922460-10922480, chr16:10923257-10923277 и chr16:10923265-10923285.

[0013] В данном документе предложен способ создания сконструированной клетки, в которой снижена или устранена поверхностная экспрессия белка MHC класса II по сравнению с немодифицированной клеткой, включающий приведение клетки в контакт с композицией, содержащей: (a) CIITA-направленную РНК, содержащую (i) направляющую последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1-117; (ii) по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 последовательных нуклеотидов последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 1-117; (iii) направляющей последовательности, на по меньшей мере 95%, 90% или 85% идентичной последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 1-117; (iv) последовательности, которая содержит 10 последовательных нуклеотидов ±10 нуклеотидов геномной координаты, указанной в Таблице 2; (v) по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 последовательных нуклеотидов последовательности из (iv) или (vi) направляющей последовательности, которая на по меньшей мере 95%, 90% или 85% идентична последовательности, выбранной из (v); и, (b) необязательно, РНК-направляемый ДНК-связывающий агент или нуклеиновую кислоту, кодирующую РНК-направляемый ДНК-связывающий агент.

[0014] В данном документе предложен способ снижения или устранения поверхностной экспрессии белка MHC класса II в сконструированной клетке по сравнению с немодифицированной клеткой, включающий приведение клетки в контакт с композицией, содержащей: (a) CIITA-направленную РНК, содержащую (i) направляющую последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1-117; (ii) по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 последовательных нуклеотидов последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 1-117; (iii) направляющей последовательности, на по меньшей мере 95%, 90% или 85% идентичной последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 1-117; (iv)

последовательности, которая содержит 10 последовательных нуклеотидов ±10 нуклеотидов геномной координаты, указанной в Таблице 2; (v) по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 последовательных нуклеотидов последовательности из (iv) или (vi) направляющей последовательности, которая на по меньшей мере 95%, 90% или 85% идентична последовательности, выбранной из (v); и, (b) необязательно, РНК-направляемый ДНК-связывающий агент или нуклеиновую кислоту, кодирующую РНК-направляемый ДНК-связывающий агент.

[0015] Дополнительные варианты осуществления предлагаются повсюду и описаны в формуле изобретения и на Фигурах.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[0016] На Фиг. 1A-B показаны результаты скрининга CIITA-направленных на эффективность редактирования Т-клеток с помощью Cas9 у двух доноров после электропорации с RNP. На Фиг. 1A показано процентное редактирование после редактирования CIITA в Т-клетках. На Фиг. 1B показан процент отрицательных по MHC класса II клеток после редактирования CIITA в Т-клетках.

[0017] На Фиг. 2A-B показаны результаты доза-реакция для редактирования Т-клеток с помощью Cas9 и трех отдельных CIITA-направленных (G013674, G013675, G013676), приготовленных в композициях LNP. На Фиг. 2A показан процент редактирования инделов в общем количестве Т-клеток (n=1). На Фиг. 2B показан процент отрицательных по MHC класса II Т-клеток после редактирования CIITA по сравнению с необработанными Т-клетками.

[0018] На Фиг. 3A-B показаны результаты скрининга доза-реакция четырех CIITA-направленных (CR002961, CR009217, CR007982 и CR007994) для редактирования Т-клеток с помощью Cas9. На Фиг. 3A показан процент редактирования в Т-клетках. На Фиг. 3B показан процент отрицательных по MHC класса II Т-клеток после редактирования CIITA.

[0019] На Фиг. 4A-B показаны результаты эффективности трех направляющих CIITA (G016086, G016092 и G016067) для редактирования Т-клеток с помощью BC22. На Фиг. 4A показан процент преобразования C в T. На Фиг. 4B показан процент отрицательных по MHC класса II Т-клеток.

[0020] На Фиг. 5A-B показаны результаты для трех CIITA-направляющих (G013676, G013675, G015535) со вставкой mCherry в локус CIITA. На Фиг. 5A показан процент mCherry-положительных CD4+ и CD8+ Т-клеток. На Фиг. 5B показан процент отрицательных по MHC класса II Т-клеток со вставкой mCherry и без нее по сравнению с необработанными Т-клетками.

[0021] На Фиг. 6A-B показаны результаты для CIITA-направляющих G016086 с Cas9 или BC22. На Фиг. 6A показан процент от общего числа прочтений для инделей, преобразования C-в-A/G и преобразования C-в-G при повышении концентрации мРНК Cas9 или мРНК BC22. На Фиг. 6B показан процент отрицательных по MHC класса II Т-клеток с увеличением концентрации мРНК Cas9 или мРНК BC22.

[0022] На Фиг. 7A-F показаны результаты последовательного редактирования в CD8+ Т-клетках. На Фиг. 7A показан процент HLA-A-положительных клеток. На Фиг. 7B показан процент положительных по MHC класса II клеток. На Фиг. 7C показан процент WT1 TCR положительных CD3+, Vb8+ клеток. На Фиг. 7D показан процент клеток CD3+, демонстрирующих неправильно спаренные TCR. На Фиг. 7E показан процент клеток CD3+, Vb8-, демонстрирующих только эндогенные TCR. На Фиг. 7F демонстрирует процент CD3+, Vb8+, положительных для TCR WT1 и отрицательных для HLA-A и MHC класса II.

[0023] На Фиг. 8A-F показаны результаты последовательного редактирования в CD4+ Т-клетках. На Фиг. 8A показан процент HLA-A-положительных клеток. На Фиг. 8B показан процент положительных по MHC класса II клеток. На Фиг. 8C показан процент WT1 TCR положительных CD3+, Vb8+ клеток. На Фиг. 8D показано процентное содержание клеток, отображающих неправильно спаренные TCR. На Фиг. 8E показан процент клеток CD3+, Vb8-, демонстрирующих только эндогенные TCR. На Фиг. 8F показан процент CD3+, Vb8+, положительных для TCR WT1 и отрицательных для HLA-A и MHC класса II.

[0024] На Фиг. 9A-D показан процент инделов после последовательного редактирования CIITA в Т-клетках (Фиг. 9A), HLA-A (Фиг. 9B), TRBC1 (Фиг. 9C) и TRBC2 (Фиг. 9D) в Т-клетках.

[0025] На Фиг. 10 показана устойчивость к опосредованному NK-клетками уничтожению Т-клеток с нокаутом HLA-A (соответствие HLA-B/C) по сравнению с Т-клетками с нокаутом B2M, необязательно включая экзогенную конструкцию HLA-E, в виде процента лизиса Т-клеток. Сравниваются клетки с нокаутом HLA-A, с двойным нокаутом HLA-A и CIITA, с нокаутом B2M, с B2M+HLA-E и дикого типа.

[0026] На Фиг. 11A-B показана экспрессия люциферазы из B2M, CIITA, HLA-A или двойных (HLA-A, CIITA) нокаутных Т-клеток человека, введенных мышам, которым инокулировали человеческие естественные клетки-киллеры. На Фиг. 11A показано излучение (фотоны/с/см2/ср) от экспрессирующих люциферазу Т-клеток, присутствующих в различные моменты времени после инъекции. На Фиг. 11B показано излучение (фотоны/с/см2/ср) от экспрессирующих люциферазу Т-клеток, присутствующих в различных группах мышей на 27-й день.

[0027] На Фиг. 12A-B показана экспрессия люциферазы из Т-клеток человека, нокаутированных по B2M и AlloWT1, которые вводили мышам, инокулированным естественными клетками-киллерами человека. На Фиг. 12A демонстрирует общий поток (фотоны/с) от Т-клеток, экспрессирующих люциферазу, присутствующих в различные моменты времени после инъекции. На Фиг. 12B показан общий поток (фотоны/с) от Т-клеток, экспрессирующих люциферазу, присутствующих в различных группах мышей через 31 день.

[0028] На Фиг. 13A-B показан процент нормализованной пролиферации хозяина CD4 (Фиг. 13A) или хозяина CD8 (Фиг. 13B) Т-клеток, инициированных двойным

нокаутом HLA класса I+HLA класса II или двойным нокаутом HLA-A и HLA класса II, сконструированных аутологичных или аллогенных Т-клеток.

[0029] На Фиг. 14A-F показана панель процентов CD8+ (Фиг. 14A), эндогенных TCR+ (Фиг. 14B), TCR+ WT1 (Фиг. 14C), нокаутных HLA-A2 (Фиг. 14D), нокаутных HLA-DRDPDQ (Фиг. 14E) и % Allo WT1 (Фиг. 14F).

[0030] На Фиг. 15 показан общий поток (фотоны/с) от Т-клеток, экспрессирующих люциферазу, присутствующих в различные моменты времени после инъекции вплоть до 18 дней.

[0031] На Фиг. 16A-16B соответственно показано высвобождение IFN-γ и IL-2 в супернатантах из анализа уничтожения, содержащего совместную культуру сконструированных Т-клеток из групп Allo-WT1, Auto-WT1, TCR KO и дикого типа (WT) с мишенью. опухолевые клетки.

[0032] На Фиг. 17A-17B показаны проценты редактирования CIITA, HLA-A, TRAC и TRBC и вставки TCR WT1 в CD8+ Т-клетках в трех условиях. Процент клеток, экспрессирующих соответствующие белки клеточной поверхности после последовательной инженерии Т-клеток, показан на Фиг. 17A для CD8+ Т-клеток. Процент Т-клеток со всеми предполагаемыми изменениями (вставка WT1-TCR в сочетании с нокаутом HLA-A и CIITA) показан на Фиг. 17B.

[0033] На Фиг. 18 показан средний процент редактирования в локусе CIITA в Т-клетках, обработанных онРНК в 100-мерном или 91-мерном форматах.

[0034] 19 показан средний процент CD8+ Т-клеток, которые являются негативными в отношении поверхностных рецепторов HLA-DR, DP, DQ после обработки онРНК в 100-мерном или 91-мерном форматах, нацеленных на CIITA.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0035] В данном изобретении предложены сконструированные клетки, а также способы и композиции для генетической модификации клетки с целью получения сконструированной клетки и популяций сконструированных клеток, которые можно использовать, например, для терапии на основе адоптивного переноса клеток (АПК). Предложенное в данном документе изобретение преодолевает определенные препятствия предшествующих способов, предоставляя способы и композиции для генетической модификации CIITA для снижения экспрессии белка MHC класса II на поверхности клетки. В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к сконструированным клеткам со сниженной или устраненной поверхностной экспрессией MHC класса II в результате генетической модификации гена CIITA. В некоторых вариантах осуществления в данном изобретении предложены композиции и способы для снижения или устранения экспрессии белка MHC класса II, а также композиции и способы для дальнейшего снижения восприимчивости клеток к иммунному отторжению. Например, в некоторых вариантах осуществления способы и композиции включают снижение или устранение поверхностной экспрессии белка MHC класса II путем генетической модификации CIITA и снижение или устранение поверхностной экспрессии

белка MHC класса I и/или вставку экзогенной нуклеиновой кислоты, кодирующей молекулу ингибитора NK-клеток, или нацеливающий рецептор, или другой полипептид (экспрессируемый на клеточной поверхности или секретируемый), в клетку путем генетической модификации. Композиции сконструированных клеток, полученные способами, описанными в данном документе, обладают желаемыми свойствами, включающими, *например*, сниженную экспрессию молекул MHC, сниженную иммуногенность in vitro и in vivo, повышенную выживаемость и повышенную генетическую совместимость с более крупными субъектами для трансплантации.

[0036] Термин «около» или «приблизительно» означает приемлемую ошибку для конкретного значения, определенную специалистом в данной области техники, которая частично зависит от того, как значение измеряется или определяется, или степень вариации, которая существенно не влияет на свойства описываемого предмета или в пределах допусков, принятых в данной области техники, *например*, в пределах 10%, 5%, 2% или 1%. Соответственно, если не указано иное, числовые параметры, приведенные в последующем описании и прилагаемой формуле изобретения, являются приблизительными и могут варьироваться в зависимости от необходимых свойств, которые стремятся получить. Как минимум, что не стоит трактовать как попытку ограничить применение доктрины эквивалентов объемом формулы изобретения, каждый числовой параметр необходимо, по меньшей мере, толковать с учетом числа приведенных значимых цифр и путем применения обычных методов округления.

Определения

[0037] Если не указано иное, следующие термины и фразы, применяемые в настоящем документе, имеют следующие значения:

[0038] Применяемый в настоящем документе термин «или их комбинации» относится ко всем перестановкам и комбинациям перечисленных терминов, предшествующих этому термину. Например, предполагается, что «A, B, C или их комбинации» включают по меньшей мере одно из: A, B, C, AB, AC, BC или ABC, и, если порядок важен в конкретном контексте, также BA, CA, CB, ACB, CBA, BCA, BAC или CAB. Продолжая этот пример, явно включены комбинации, которые содержат повторы одного или большего количества элементов или терминов, таких как BB, AAA, AAB, BBC, CBBA, CABA и так далее. Специалист в данной области техники поймет, что обычно количество элементов или терминов в любой комбинации не ограничено, если иное не очевидно из контекста.

[0039] Применяемый в настоящем документе термин «набор» относится к упакованному набору связанных компонентов, таких как один или большее количество полинуклеотидов или композиций, и один или большее количество связанных материалов, таких как устройства для доставки (например, шприцы), растворители, растворы, буферы, инструкции, или осушители.

[0040] Применяемая в настоящем документе «аллогенная» клетка, относится к клетке, происходящей от субъекта-донора того же вида, что и субъект-реципиент, при

этом субъект-донор и субъект-реципиент имеют генетические различия, *например*, гены в одном или большем количестве локусов, которые не идентичны. Таким образом, например, клетка является аллогенной по отношению к субъекту, которому эту клетку вводят. Применяемая в настоящем документе, клетка, которая удалена или изолирована от донора, которая не будет повторно введена исходному донору, считается аллогенной клеткой.

[0041] Применяемый в настоящем документе термин «аутологичная» клетка относится к клетке, полученной от того же субъекта, которому позднее будет повторно введен материал. Таким образом, *например*, клетка считается аутологичной, если ее удаляют у субъекта, а затем повторно вводят тому же субъекту.

[0042] «β2M» или «B2M», как применяется в настоящем документе, относится к последовательности нуклеиновой кислоты или белковой последовательности «β-2 микроглобулина»; ген человека имеет инвентарный номер NC_000015 (диапазон 44711492..44718877), ссылка GRCh38.p13. Белок B2M связан с молекулами MHC класса I в виде гетеродимера на поверхности ядерных клеток и необходим для экспрессии белка MHC класса I.

[0043] «CIITA», или «CIITA», или «C2TA», как применяется в настоящем документе, относится к последовательности нуклеиновой кислоты или белковой последовательности «трансактиватора главного комплекса гистосовместимости класса II»; ген человека имеет инвентарный номер NC_000016.10 (диапазон 10866208..10941562), ссылка GRCh38.p13. Белок CIITA в ядре действует как положительный регулятор транскрипции гена MHC класса II и необходим для экспрессии белка MHC класса II.

[0044] Используемый в данном документе термин «MHC» или «молекула(ы) MHC», или «белок MHC», или «комплекс(ы) MHC» относится к молекуле главного комплекса гистосовместимости (или во множественном числе) и включает, *например*, молекулы MHC класса I и MHC класса II. У людей молекулы MHC называются комплексами «лейкоцитарного антигена человека», или «молекулами HLA», или «белком HLA». Использование терминов «MHC» и «HLA» не предназначено для ограничения; используемый в данном документе термин «MHC» может использоваться для обозначения молекул MHC человека, *т.е.* молекул HLA. Поэтому термины «MHC» и «HLA» используются в данном документе взаимозаменяемо.

[0045] Применяемый в настоящем документе термин «HLA-A», в контексте белка HLA-A, относится к молекуле белка MHC класса I, которая представляет собой гетеродимер, состоящий из тяжелой цепи (кодируемой геном HLA-A) и легкой цепи (*например*, бета-2-микроглобулин). Применяемый в настоящем документе термин «HLA-A» или «ген HLA-A», в контексте нуклеиновых кислот, относится к гену, кодирующему тяжелую цепь молекулы белка HLA-A. Ген HLA-A также называют «гистосовместимостью HLA класса I, альфа-цепью»; ген человека имеет инвентарный номер NC_000006.12 (29942532..29945870). Известно, что ген HLA-A имеет тысячи различных генотипических версий гена HLA-A в популяции (и индивидуум может

получить два разных аллеля гена HLA-A). Доступ к общедоступной базе данных аллелей HLA-A, включая информацию о последовательности, можно получить на сайте IPD-IMGT/HLA: https://www.ebi.ac.uk/ipd/imgt/hla/. Все аллели HLA-A охватываются терминами «HLA-A» и «ген HLA-A».

[0046] В данном документе термин «HLA-B», в контексте нуклеиновых кислот, относится к гену, кодирующему тяжелую цепь молекулы белка HLA-B. HLA-B также называют «гистосовместимостью HLA класса I, B альфа-цепью»; ген человека имеет инвентарный номер NC_000006.12 (31353875..31357179).

[0047] Применяемый в настоящем документе «HLA-C», в контексте нуклеиновых кислот, относится к гену, кодирующему тяжелую цепь молекулы белка HLA-C HLA-C также называют «гистосовместимостью HLA класса I, C альфа-цепью»; ген человека имеет инвентарный номер NC_000006.12 (31268749..31272092).

[0048] Применяемый в настоящем документе термин «в пределах геномных координат» включает границы заданного диапазона геномных координат. Например, если указано chr6:29942854-chr6:29942913, охватываются координаты chr6:29942854-chr6:29942913. В настоящей заявке геномные координаты, на которые делается ссылка, основаны на геномных аннотациях в сборке генома человека GRCh38 (также называемой hg38) от Консорциума справочных материалов по геномам, доступной на веб-сайте Национального центра биотехнологической информации. Инструменты и способы преобразования геномных координат между одной сборкой и другой известны в данной области техники и могут быть применены для преобразования предложенных в настоящем изобретении геномных координат в соответствующие координаты в другой сборке генома человека, включая преобразование в более раннюю сборку, сгенерированную тем же учреждением или с применением того же алгоритма (например, из GRCh38 в GRCh37), и преобразование сборки, созданной другим учреждением или алгоритмом (например, из GRCh38 в NCBI33, сгенерированный Международным консорциумом по секвенированию генома человека). Доступные способы и инструменты, известные в данной области техники, включают в себя, помимо прочего, Службу перераспределения генома NCBI, доступную на веб-сайте Национального центра биотехнологической информации, UCSC LiftOver, доступную на веб-сайте UCSC Genome Brower, и Assembly Converter, доступную на веб-сайте Ensembl.org.

[0049] «Экзон», используемый в данном документе, относится к нуклеиновым кислотам в гене, которые кодируют транскрипт зрелой РНК. В случае гена CIITA геномные координаты начала и конца каждого экзона в гене известны и представлены в **таблице 1**.

[0050] Используемый в данном документе термин «субъект» включает живые организмы, у которых может быть вызван иммунный ответ, включая, *например*, млекопитающих, приматов, людей.

[0051] В настоящем документе «полинуклеотид» и «нуклеиновая кислота» применяется для обозначения мультимерного соединения, включающего нуклеозиды или

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

[0052] «Направляющая РНК», «нРНК» и просто «направляющая» применяется в данном документе взаимозаменяемо для обозначения, например, направляющей, которая направляет РНК-направляемый ДНК-связывающий агент к целевой ДНК и может представлять собой одиночную направляющую РНК или комбинацию crРНК и trРНК (также известная как tracrРНК). Примеры нРНК включают направляющие РНК нуклеазы Cas класса II в модифицированной или немодифицированной формах. crРНК и trРНК могут быть связаны в виде одиночной молекулы РНК (одиночная направляющая РНК, онРНК) или в виде двух отдельных цепей РНК (двойная направляющая РНК, днРНК). Термин «направляющая РНК» или «нРНК» относится к каждому типу. trРНК может

представлять собой встречающуюся в природе последовательность или последовательность trРНК с модификациями или вариациями по сравнению с встречающимися в природе последовательностями. Используемый в данном документе термин «направляющая последовательность» относится к последовательности в направляющей РНК, которая комплементарна целевой последовательности и выполняет функции для направления направляющей РНК к целевой последовательности для связывания или модификации (например, расщепления) с помощью ДНК-связывающего агента, направляемого РНК. «Гидовая последовательность» также может называться «нацеливающей последовательностью» или «спейсерной последовательностью». Направляющая последовательность может иметь длину 20 пар оснований, например в случае Streptococcus pyogenes (*m.e.* Spy Cas9 (SpCas9)) и родственных гомологов/ортологов Cas9. В качестве направляющих также можно использовать более короткие или длинные последовательности, например, длиной 15, 16, 17, 18, 19, 21, 22, 23, 24 или 25 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления целевая последовательность находится в гене или на хромосоме, например, и является комплементарной гидовой последовательности. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения степень комплементарности или идентичности между гидовой последовательностью и соответствующей ей целевой последовательностью может составлять около 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%. В некоторых вариантах осуществления гидовая последовательность и целевая область могут быть на 100% комплементарны или идентичны. В других вариантах осуществления гидовая последовательность и целевая область могут содержать по меньшей мере одно несовпадение. Например, направляющая последовательность и целевая последовательность могут содержать 1, 2, 3 или 4 несовпадения, причем общая длина целевой последовательности составляет по меньшей мере 17, 18, 19, 20 или более пар оснований. В некоторых вариантах осуществления направляющая последовательность и целевая область могут содержать 1-4 несовпадений, причем направляющая последовательность содержит по меньшей мере 17, 18, 19, 20 или более нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления гидовая последовательность и целевая область могут содержать 1, 2, 3 или 4 несовпадения, причем гидовая последовательность содержит 20 нуклеотидов.

[0053] Целевые последовательности для РНК-направляемых ДНК-связывающих агентов включают как положительные, так и отрицательные цепи геномной ДНК (*m.e.* данная последовательность и обратный комплемент целевой последовательности), в качестве субстрата нуклеиновой кислоты для РНК-направляемого ДНК-связывающего агента представляет собой двухцепочечную нуклеиновую кислоту. Соответственно, когда говорят, что гидовая последовательность является «комплементарной целевой последовательности», следует понимать, что гидовая последовательность может направлять гидовую РНК для связывания с обратным комплементом целевой последовательности. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления, если гидовая

последовательность связывается с обратным комплементом целевой последовательности, гидовая последовательность является идентичной определенным нуклеотидам целевой последовательности (например, целевой последовательности, не включающей PAM) за исключением замены U на T в гидовой последовательности.

[0054] Применяемый в настоящем документе термин « РНК-направляемый ДНК-связывающий агент» означает полипептид или комплекс полипептидов, обладающих активностью связывания РНК и ДНК, или ДНК-связывающую субъединицу такого комплекса, при этом ДНК-связывающая активность специфична для последовательности и зависит от последовательности РНК. Иллюстративные РНК-направляемые ДНК-связывающие агенты включают Cas-клевазы/никазы и их инактивированные формы («ДНК-связывающие агенты dCas»). Применяемый в настоящем документе термин «Cas-нуклеаза», охватывает Cas-клевазы, Cas-никазы и ДНК-связывающие агенты dCas. Cas-клевазы/никазы и ДНК-связывающие агенты dCas включают в себя комплекс Csm или Cmr системы CRISPR типа III, ее субъединицу Cas10, Csm1 или Cmr2, комплекс Cascade системы CRISPR типа I, ее субъединицу Cas3 и Cas-нуклеазы класса 2. Используемый в данном документе термин «Cas-нуклеаза класса 2» представляет собой одноцепочечный полипептид с РНК-направляемой ДНК-связывающей активностью. Cas-нуклеазы класса 2 включают Cas-клевазы/никазы класса 2 (например, варианты H840A, D10A или N863A), которые дополнительно обладают РНК-направляемой клевазной или никазной активностью в отношении ДНК, и ДНК-связывающие агенты dCas класса 2, в которых активность клевазы/никазы инактивируется. Нуклеазы Cas класса 2 включают, например, белки Cas9, Cpf1, C2c1, C2c2, C2c3, HF Cas9 (например, варианты N497A, R661A, Q695A, Q926A), HypaCas9 (например, варианты N692A, M694A, Q695A, H698A), eSPCas9(1.0) (*например*, варианты K810A, K1003A, R1060A) и eSPCas9(1.1) (*например*, варианты K848A, K1003A, R1060A) и их модификации. Белок Cpf1, Zetsche et al., Cell, 163: 1-13 (2015), гомологичен Cas9 и содержит RuvC-подобный нуклеазный домен. Последовательности Cpf1 из Zetsche включены посредством ссылки во всей их полноте. См., например, Zetsche, таблицы S1 и S3. См., например, Makarova et al., Nat Rev Microbiol, 13(11): 722-36 (2015); Shmakov et al., Molecular Cell, 60:385-397 (2015).

[0055] Применяемый в настоящем документе термин «редактор» относится к агенту, содержащему полипептид, способный производить модификацию в последовательности ДНК. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения редактор представляет собой кливазу, такую как кливаза Cas9. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения редактор способен дезаминировать основание в молекуле ДНК. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения редактор способен дезаминировать цитозин (C) в ДНК. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения редактор представляет собой слитый белок, содержащий РНК-направляемую никазу, слитую с цитидиндезаминазой. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения редактор представляет собой слитый белок, содержащий РНК-направляемую никазу, слитую с деаминазой APOBEC3A (A3A). В

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

[0056] Применяемый в настоящем документе термин «цитидиндезаминаза» означает полипептид или комплекс полипептидов, которые способны проявлять активность цитидиндезаминазы, которая катализирует гидролитическое дезаминирование цитидина или дезоксицитидина, обычно приводящее к образованию уридина или дезоксиуридина. Цитидиндезаминазы охватывают ферменты надсемейства цитидиндезаминаз и, в частности, ферменты семейства APOBEC (подгруппы ферментов APOBEC1, APOBEC2, APOBEC4 и APOBEC3), индуцированную активацией цитидиндезаминазу (AID или AICDA) и CMP-дезаминазу (см., например, Conticello et al., Mol. Biol. Evol. 22:367-77, 2005; Conticello, Genome Biol. 9:229, 2008; Muramatsu et al., J. Biol. Chem. 274: 18470-6, 1999); Carrington et al., Cells 9:1690 (2020)).

[0057] Применяемый в настоящем документе термин «APOBEC3» относится к белку APOBEC3, такому как белок APOBEC3, экспрессируемый любым из семи генов (A3A-A3H) локуса APOBEC3 человека. APOBEC3 может обладать каталитической активностью редактирования ДНК или РНК. Аминокислотная последовательность APOBEC3A была описана (идентификатор доступа UniPROT: p31941) и включена в настоящий документ как SEQ ID NO: 40. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения белок APOBEC3 представляет собой белок APOBEC3 человека и/или белок дикого типа. Варианты включают белки, имеющие последовательность, которые отличаются от белка APOBEC3 дикого типа одной или несколькими мутациями (т.е. , заменами, делециями, вставками), такими как одна или несколько точечных замен. Например, можно применять укороченную последовательность APOBEC3, т.е. удалением нескольких N-концевых или C-концевых аминокислот, предпочтительно от одной до четырех аминокислот на C-конце последовательности. Применяемый в настоящем документе термин «вариант» относится к аллельным вариантам, вариантам сплайсинга и природным или искусственным мутантам, которые гомологичны эталонной последовательности APOBEC3. Вариант является «функциональным» в том смысле, что он проявляет каталитическую активность в редактировании ДНК или РНК. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения APOBEC3 (такой как человеческий APOBEC3A) аминокислота дикого типа имеет позицию 57 (как пронумеровано в последовательности дикого типа). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения APOBEC3 (такой как человеческий APOBEC3A) аминокислота содержит аспарагин в позиции 57 (как пронумеровано в последовательности дикого типа).

[0058] Применяемый в настоящем документе термин «никаза» представляет собой фермент, который создает одноцепочечный разрыв (также известный как «разрыв») в двухцепочечной ДНК, т. е. разрезает одну цепь двойной спирали ДНК, но не другую.

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

[0059] Применяемый в настоящем документе термин «слитый белок» относится к гибридному полипептиду, который содержит белковые домены по меньшей мере из двух разных белков. Один белок может быть расположен на аминоконцевой (N-концевой) части слитого белка или на карбоксиконцевом (С-концевом) белке, образуя таким образом «аминоконцевой слитый белок» или «карбоксиконцевой слитый белок», соответственно. Любой из предложенных в настоящем изобретении белков может быть получен любым способом, известным в данной области техники. Например, представленные в настоящем документе белки могут быть получены посредством экспрессии и очистки рекомбинантных белков, что особенно подходит для слитых белков, содержащих пептидный линкер. Методы экспрессии и очистки рекомбинантных белков хорошо известны и включают методы, описанные в Green and Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (4th ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (2012)), полное содержание которой включено в данный документ посредством ссылки.

[0060] Применяемый в настоящем документе термин «линкер», относится к химической группе или молекуле, связывающей две соседние молекулы или фрагменты. Как правило, линкер расположен между двумя группами, молекулами или другими фрагментами или окружен ими и соединен с каждым из них ковалентной связью. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения линкер представляет собой аминокислоту или множество аминокислот (например, пептид или белок), такой как линкер «XTEN» из 16 аминокислотных остатков или его вариант (см., например, Примеры; и Schellenberger et al. A recombinant polypeptide extends the in vivo half-life of

peptides and proteins in a tunable manner. Nat. Biotechnol. 27, 1186-1190 (2009)). В некоторых вариантах осуществления линкер XTEN включает последовательность SGSETPGTSESATPES (SEQ ID NO: 900), SGSETPGTSESA (SEQ ID NO: 901) или SGSETPGTSESATPEGGSGGS (SEQ ID NO: 902).

[0061] Применяемый в настоящем документе термин «ингибитор урацил-гликозилазы» или «UGI» относится к белку, который способен ингибировать фермент репарации оснований урацил-ДНК-гликозилазы (UDG).

[0062] Применяемый в настоящем документе термин «открытая рамка считывания» или «ORF» гена относится к последовательности, состоящей из серии кодонов, которые определяют аминокислотную последовательность белка, кодируемого геном. ORF начинается со стартового кодона (например, ATG в ДНК или AUG в РНК) и заканчивается стоп-кодоном, например, TAA, TAG или TGA в ДНК или UAA, UAG или UGA в РНК.

[0063] Применяемый в настоящем документе термин «рибонуклеопротеин» (RNP) или «комплекс RNP» относится к направляющей РНК вместе с РНК-направляемым ДНК-связывающим агентом, таким как Cas-нуклеаза, например, Cas-клеваза, Cas-никаза или ДНК-связывающий агент dCas. (например, Cas9). В некоторых вариантах осуществления направляющая РНК направляет РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, такой как Cas9, к целевой последовательности, а направляющая РНК гибридизируется с целевой последовательностью и связывается с ней; в случаях, когда агент представляет собой клевазу или никазу, за связыванием может следовать расщепление или разрыв.

[0064] Как используется в данном документе, считается, что первая последовательность «содержит последовательность с по меньшей мере X% идентичности» со второй последовательностью, если выравнивание первой последовательности со второй последовательностью демонстрирует, что X% или более из положений во второй последовательности полностью соответствуют первой последовательности. Например, последовательность AAGA содержит последовательность со 100% идентичностью с последовательностью AAG, потому что выравнивание дало бы 100% идентичность в том смысле, что имеются совпадения во всех трех положениях второй последовательности. Различия между РНК и ДНК (обычно обмен уридина на тимидин или наоборот) и присутствие нуклеозидных аналогов, таких как модифицированные уридины, не способствуют различиям в идентичности или комплементарности среди полинуклеотидов поскольку соответствующие нуклеотиды (такие как тимидин, уридин или модифицированный уридин) имеют один и тот же комплемент (например, аденозин для всех из тимидина, уридина или модифицированного уридина; другим примером являются цитозин и 5-метилцитозин, оба из которых содержат в качестве комплементарного основания гуанозин или модифицированный гуанозин). Так, например, последовательность 5’-AXG, где X представляет собой любой модифицированный уридин, такой как псевдоуридин, N1-метилпсевдоуридин или 5-метоксиуридин, считается на 100% идентичным AUG, поскольку оба они полностью комплементарны одной и той же последовательности (5’-CAU). Примерами алгоритмов

выравнивания являются алгоритмы Смита-Уотермана и Нидлмана-Вунша, которые хорошо известны в данной области техники. Специалисту в данной области техники будет понятно, какой алгоритм выбрать и какие настройки параметров подходят для данной пары последовательностей, которые должны быть выровнены; для последовательностей в общем одинаковой длины и ожидаемой идентичности >50% для аминокислот или >75% для нуклеотидов, как правило, подходит алгоритм Нидлмана-Вунша со стандартными настройками интерфейса алгоритма Нидлмана-Вунша, предоставляемого EBI на веб-сервере www.ebi.ac.uk.

[0065] Применяемый в настоящем документе термин «мРНК» относится к полинуклеотиду, и содержит открытую рамку считывания, которая может транслироваться в полипептид (*т.е.*, может служить субстратом для трансляции с помощью рибосомы и аминоацилированной тРНК). мРНК может содержать сахарофосфатный остов, включающий остатки рибозы или их аналоги, например, остатки 2'-метоксирибозы. В некоторых вариантах осуществления сахара сахарофосфатного остова мРНК состоят по существу из остатков рибозы, остатков 2'-метоксирибозы или их комбинации.

[0066] Применяемый в данном документе термин «индел» относится к вставным/делеционным мутациям, состоящим из ряда нуклеотидов, которые либо вставлены, либо удалены, например, в месте двухцепочечных разрывов (DSB) в целевой нуклеиновой кислоте.

[0067] Применяемый в настоящем документе термин «снижение или устранение» экспрессии белка в клетке относится к частичной или полной потере экспрессии белка по сравнению с немодифицированной клеткой. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения поверхностная экспрессия белка на клетке измеряется с помощью проточной цитометрии и имеет «сниженную или устраненную» поверхностную экспрессию по сравнению с немодифицированной клеткой, о чем свидетельствует снижение флуоресцентного сигнала при окрашивании тем же антителом против белка. Клетка, которая имеет «сниженную или устраненную» поверхностную экспрессию белка с помощью проточной цитометрии по сравнению с немодифицированной клеткой, может быть названа «отрицательной» в отношении экспрессии этого белка, о чем свидетельствует сигнал флуоресценции, аналогичный сигналу клетки, окрашенной антителом изотипического контроля. «Снижение или устранение» экспрессии белка можно измерить другими известными в данной области техники методиками с соответствующими контролями, известными специалистам в данной области техники.

[0068] В контексте данного документа термин «нокдаун» относится к снижению экспрессии конкретного продукта гена (например, белка, мРНК или обоих), например, по сравнению с экспрессией неотредактированной целевой последовательности. Нокдаун белка можно измерить путем определения общего клеточного количества белка в образце, таком как ткань, жидкость или клеточная популяция. Его также можно измерить путем измерения суррогата, маркера или активности белка. Способы измерения нокдауна мРНК

известны и включают анализ мРНК, выделенной из представляющего интерес образца. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения «нокдаун» может относиться к некоторой потере экспрессии конкретного продукта гена, например, к уменьшению количества транскрибируемой мРНК или уменьшению количества белка, экспрессируемого клеткой или популяцией клеток (включая in vivo популяции, такие как были обнаруженные в тканях).

[0069] Применяемый в настоящем документе термин «нокаут» относится к потере экспрессии определенного гена или определенного белка в клетке. Нокаут может привести к снижению экспрессии ниже уровня обнаружения анализа. Нокаут можно измерить либо путем определения общего клеточного количества белка в клетке, ткани или популяции клеток.

[0070] Используемый в данном документе термин «целевая последовательность» или «геномная целевая последовательность» относится к последовательности нуклеиновой кислоты в целевом гене, которая комплементарна направляющей последовательности нРНК. Взаимодействие целевой последовательности и направляющей последовательности направляет РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, для связывания и, возможно, разрыва или расщепления (в зависимости от активности агента) внутри целевой последовательности.

[0071] Применяемый в настоящем документе термин «лечение» относится к любому введению или применению терапевтического средства для лечения заболевания или расстройства у субъекта и включает ингибирование заболевания, остановку его развития, облегчение одного или большего количества симптомов заболевания, излечение заболевания или предотвращение одного из них или большее количество симптомов заболевания, включая рецидив симптома.

[0072] Далее будут подробно рассмотрены некоторые варианты осуществления настоящего изобретения, примеры которых проиллюстрированы на прилагаемых чертежах. Хотя изобретение описано в связи с проиллюстрированными вариантами осуществления, следует понимать, что они не предназначены для ограничения изобретения этими вариантами осуществления. Напротив, изобретение предназначено для охвата всех альтернатив, модификаций и эквивалентов, которые могут быть включены в изобретение, как определено прилагаемой формулой изобретения и включенными вариантами осуществления.

[0073] Прежде чем настоящие идеи будут описаны более подробно, следует понимать, что раскрытие не ограничивается конкретными композициями или стадиями процессов, поскольку они могут варьироваться. Следует отметить, что при применении в данном описании и прилагаемой формуле формы единственного числа включают ссылки на множественное число, если контекст явно не указывает иное. Таким образом, например, ссылка на «конъюгат» включает множество конъюгатов, а ссылка на «клетку» включает множество клеток и тому подобное.

[0074] Числовые диапазоны включают в себя числа, определяющие диапазон. Измеряемые и измеримые значения считаются приблизительными с учетом значащих цифр и ошибки, связанной с измерением. Кроме того, применение слов «содержат», «содержит», «содержащий», «состоят из», «состоит из», «состоящий из», «включают», «включает» и «включающий» не является ограничивающим. Следует понимать, что как приведенное выше общее описание, так и приведенное ниже подробное описание являются просто иллюстративными и пояснительными и не ограничивают пункты заявленной формулы.

[0075] Если специально не указано в описании, варианты осуществления в описании, которые содержат «содержащие» различные компоненты, также рассматриваются как «состоящие из» или «состоящие по существу из» указанных компонентов; варианты осуществления в описании, которые содержат «состоящий из» различных компонентов, также рассматриваются как «содержащие» или «состоящие в основном из» указанных компонентов; и варианты осуществления в описании, в которых говорится, что «состоит в основном из» различных компонентов, также рассматриваются как «состоящие из» или «содержащие» указанные компоненты (эта взаимозаменяемость не применяется к применению этих терминов в формуле изобретения). Термин «или» применяется во всеобъемлющем смысле, *т. е.* эквивалентен «и/или», если контекст явно не указывает иное.

[0076] Заголовки разделов, используемые в данном документе, предназначены только для организационных целей и не должны рассматриваться как ограничивающие объект изобретения каким-либо образом. В случае, если какой-либо материал, включенный в качестве ссылки, противоречит любому термину, определенному в данном описании, или любому другому прямому содержанию в данном описании, это описание является превалирующим. Хотя настоящие идеи описаны в сочетании с различными вариантами осуществления, не предполагается, что настоящие идеи ограничиваются такими вариантами осуществления. Напротив, настоящие идеи охватывают различные альтернативы, модификации и эквиваленты, что будет понятно специалистам в данной области техники.

Генетически модифицированные клетки

Композици сконструированных клеток

[0077] В данном изобретении предложены композиции сконструированных клеток, в которых снижена или устранена поверхностная экспрессия MHC класса II по сравнению с немодифицированной клеткой. В некоторых вариантах осуществления композиция сконструированных клеток содержит генетическую модификацию гена CIITA. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения сконструированная клетка представляет собой аллогенную клетку. В некоторых вариантах осуществления сконструированная клетка со сниженной экспрессией MHC класса II применима для терапии на основе адоптивного переноса клеток. В некоторых вариантах осуществления сконструированная клетка содержит дополнительные генетические модификации в геноме

клетки для получения клетки, подходящей для целей аллогенной трансплантации.

[0078] Применяемый в настоящем документе термин «в пределах геномных координат» включает границы заданного диапазона геномных координат. Например, если указано chr16:10895702-10895722, охватываются координаты chr16:10895702 и chr16:10895722.

[0079] В некоторых вариантах осуществления для каждого заданного диапазона геномных координат диапазон может охватывать +/- 10 нуклеотидов на любом конце указанных координат. Для каждого заданного диапазона геномных координат диапазон может охватывать +/- 5 нуклеотидов на любом конце диапазона. Например, если указано chr16: 10895702-10895722, в некоторых вариантах осуществления геномная целевая последовательность или генетическая модификация могут находиться в пределах chr16:10895692-10895732.

[0080] Генетические модификации в гене CIITA описаны далее в данном документе. В некоторых вариантах осуществления генетическая модификация в гене CIITA включает любую одну или большее количество вставок, делеций, замен или дезаминирования по меньшей мере одного нуклеотида в целевой последовательности.

[0081] В некоторых вариантах осуществления заданный диапазон геномных координат может включать целевую последовательность на обеих цепях ДНК (*m.e.* плюс (+) цепь и минус (-) цепь).

[0082] В некоторых вариантах осуществления предложена сконструированная клетка, в которой снижена или устранена поверхностная экспрессия MHC класса II по сравнению с немодифицированной клеткой, содержащая генетическую модификацию в гене CIITA, при этом геномная модификация включает по меньшей мере один нуклеотид экзона в пределах геномных координат chr16: 10902662-chr16:10923285.

[0083] Границы экзонов в гене CIITA известны и представлены в **таблице 1** ниже на основе транскрипта ENST00000618327. См. https://useast.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/Exons?db=core;g=ENSG00000179583;r=16:10866222-10943021;t=ENST00000618327.

[0084] **Таблица 1. Границы области CIITA (транскрипт hg38: CIITA-214 ENST00000618327.4).**

Экзон №	Старт (хромосома 6)	Конец (хромосома 6)
1	10877198	10877382
2	10895282	10895428
3	10895669	10895764
4	10898670	10898732
5	10898922	10899002
6	10901514	10901558
7	10902038	10902184

8	10902658	10902801
9	10903731	10903895
10	10904744	10904812
11	10906499	10908149
12	10909029	10909187
13	10910188	10910259
14	10915570	10915650
15	10916367	10916459
16	10918440	10918526
17	10922167	10922250
18	10922407	10922490
19	10923228	10923325
20	10923878	10924983

[0085] В некоторых вариантах осуществления предложена сконструированная клетка, в которой снижена или устранена поверхностная экспрессия MHC класса II по сравнению с немодифицированной клеткой, содержащая генетическую модификацию в гене CIITA, при этом генетическая модификация включает по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 6, по меньшей мере 7, по меньшей мере 8, по меньшей мере 9 или по меньшей мере 10 последовательных нуклеотидов в пределах геномных координат chr16: 10902662-chr16:10923285.

[0086] В некоторых вариантах осуществления предложена сконструированная клетка, в которой снижена или устранена поверхностная экспрессия MHC класса II по сравнению с немодифицированной клеткой, содержащая генетическую модификацию в гене CIITA, причем генетическая модификация включает по меньшей мере 5 последовательных нуклеотидов в пределах геномных координат chr16: 10902662-chr16:10923285.

[0087] В некоторых вариантах осуществления предложена сконструированная клетка, в которой снижена или устранена поверхностная экспрессия MHC класса II по сравнению с немодифицированной клеткой, содержащая генетическую модификацию в гене CIITA, причем генетическая модификация включает по меньшей мере 6, 7, 8, 9 или 10 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат chr16: 10902662-chr16:10923285. В некоторых вариантах осуществления предложена сконструированная клетка, в которой снижена или устранена поверхностная экспрессия MHC класса II по сравнению с немодифицированной клеткой, содержащая генетическую модификацию в гене CIITA, причем генетическая модификация включает по меньшей мере 6 последовательных нуклеотидов в пределах геномных координат chr16: 10902662-chr16:10923285. В некоторых вариантах осуществления предложена сконструированная клетка, в которой снижена или устранена поверхностная экспрессия MHC класса II по

сравнению с немодифицированной клеткой, содержащая генетическую модификацию в гене CIITA, причем генетическая модификация включает по меньшей мере 7 последовательных нуклеотидов в пределах геномных координат chr16: 10902662-chr16:10923285. В некоторых вариантах осуществления предложена сконструированная клетка, в которой снижена или устранена поверхностная экспрессия MHC класса II по сравнению с немодифицированной клеткой, содержащая генетическую модификацию в гене CIITA, причем генетическая модификация включает по меньшей мере 8 последовательных нуклеотидов в пределах геномных координат chr16: 10902662-chr16:10923285. В некоторых вариантах осуществления предложена сконструированная клетка, в которой снижена или устранена поверхностная экспрессия MHC класса II по сравнению с немодифицированной клеткой, содержащая генетическую модификацию в гене CIITA, причем генетическая модификация включает по меньшей мере 9 последовательных нуклеотидов в пределах геномных координат chr16: 10902662-chr16:10923285. В некоторых вариантах осуществления предложена сконструированная клетка, в которой снижена или устранена поверхностная экспрессия MHC класса II по сравнению с немодифицированной клеткой, содержащая генетическую модификацию в гене CIITA, причем генетическая модификация включает по меньшей мере 10 последовательных нуклеотидов в пределах геномных координат chr16: 10902662-chr16:10923285.

[0088] В некоторых вариантах осуществления предложена сконструированная клетка, в которой снижена или устранена поверхностная экспрессия MHC класса II по сравнению с немодифицированной клеткой, содержащая генетическую модификацию в гене CIITA, при этом генетическая модификация включает по меньшей мере одну замену C на T или по меньшей мере одну замену A на G в пределах геномных координат chr16: 10902662-chr16:10923285. В некоторых вариантах осуществления предложена сконструированная клетка, в которой снижена или устранена поверхностная экспрессия MHC класса II по сравнению с немодифицированной клеткой, содержащая генетическую модификацию в гене CIITA, при этом геномная модификация включает по меньшей мере одну замену C на T в пределах геномных координат chr16: 10902662-chr16:10923285. В некоторых вариантах осуществления предложена сконструированная клетка, в которой снижена или устранена поверхностная экспрессия MHC класса II по сравнению с немодифицированной клеткой, содержащая генетическую модификацию в гене CIITA, при этом геномная модификация включает по меньшей мере одну замену A на G в пределах геномных координат chr16: 10902662-chr16:10923285.

[0089] В некоторых вариантах осуществления предложена сконструированная клетка, в которой снижена или устранена поверхностная экспрессия MHC класса II по сравнению с немодифицированной клеткой, содержащая генетическую модификацию в гене CIITA, при этом геномная модификация включает по меньшей мере один нуклеотид экзона в пределах геномных координат chr16:10906542-chr16:10923285.

[0090] В некоторых вариантах осуществления предложена сконструированная

клетка, в которой снижена или устранена поверхностная экспрессия MHC класса II по сравнению с немодифицированной клеткой, содержащая генетическую модификацию в гене CIITA, при этом геномная модификация включает по меньшей мере один нуклеотид экзона в пределах геномных координат chr16:10906542-chr16:10908121.

[0091] В некоторых вариантах осуществления предложена сконструированная клетка, в которой снижена или устранена поверхностная экспрессия MHC класса II по сравнению с немодифицированной клеткой, содержащая генетическую модификацию в гене CIITA, при этом генетическая модификация включает по меньшей мере один нуклеотид экзона в пределах геномных координат, выбранных из: chr16:10916432-10916452, chr16:10922444-10922464, chr16:10907924-10907944, chr16:10906985-10907005, chr16:10908073-10908093, chr16:10907433-10907453, chr16:10907979-10907999, chr16:10907139-10907159, chr16:10922435-10922455, chr16:10907384-10907404, chr16:10907434-10907454, chr16:10907119-10907139, chr16:10907539-10907559, chr16:10907810-10907830, chr16:10907315-10907335, chr16:10916426-10916446, chr16:10909138-10909158, chr16:10908101-10908121, chr16:10907790-10907810, chr16:10907787-10907807, chr16:10907454-10907474, chr16:10895702-10895722, chr16:10902729-10902749, chr16:10918492-10918512, chr16:10907932-10907952, chr16:10907623-10907643, chr16:10907461-10907481, chr16:10902723-10902743, chr16:10907622-10907642, chr16:10922441-10922461, chr16:10902662-10902682, chr16:10915626-10915646, chr16:10915592-10915612, chr16:10907385-10907405, chr16:10907030-10907050, chr16:10907935-10907955, chr16:10906853-10906873, chr16:10906757-10906777, chr16:10907730-10907750 и chr16:10895302-10895322.

[0092] В некоторых вариантах осуществления предложена сконструированная клетка в которой снижена или устранена поверхностная экспрессия MHC класса II по сравнению с немодифицированной клеткой, содержащая генетическую модификацию в гене CIITA, при этом генетическая модификация включает по меньшей мере один нуклеотид экзона в пределах геномных координат, выбранных из: chr16:10907539-10907559, chr16:10916426-10916446, chr16:10906907-10906927, chr16:10895702-10895722, chr16:10907757-10907777, chr16:10907623-10907643, chr16:10915626-10915646, chr16:10906756-10906776, chr16:10907476-10907496, chr16:10907385-10907405 и chr16:10923265-10923285.

[0093] В некоторых вариантах осуществления предложена сконструированная клетка в которой снижена или устранена поверхностная экспрессия MHC класса II по сравнению с немодифицированной клеткой, содержащая генетическую модификацию в гене CIITA, при этом генетическая модификация включает по меньшей мере один нуклеотид экзона в пределах геномных координат, выбранных из: chr16:10906853-10906873, chr16:10922444-10922464, chr16:10907924-10907944, chr16:10907315-10907335, chr16:10916432-10916452, chr16:10907932-10907952, chr16:10915626-10915646, chr16:10907586-10907606, chr16:10916426-10916446, chr16:10907476-10907496, chr16:10907787-10907807, chr16:10907979-10907999, chr16:10906904-10906924 и

chr16:10909138-10909158.

[0094] В некоторых вариантах осуществления предложена сконструированная клетка, в которой снижена или устранена поверхностная экспрессия MHC класса II по сравнению с немодифицированной клеткой, содержащая генетическую модификацию в гене CIITA, при этом геномная модификация включает по меньшей мере один нуклеотид экзона в пределах геномных координат выбранных из: chr16:10895702-10895722, chr16:10916432-10916452, chr16:10907623-10907643, chr16:10907932-10907952, chr16:10906985-10907005, chr16:10915626-10915646, chr16:10907539-10907559, chr16:10916426-10916446, chr16:10907476-10907496, chr16:10907119-10907139, chr16:10907979-10907999 и chr16:10909138-10909158.

[0095] В некоторых вариантах осуществления предложена сконструированная клетка, в которой снижена или устранена поверхностная экспрессия MHC класса II по сравнению с немодифицированной клеткой, содержащая генетическую модификацию в гене CIITA, при этом генетическая модификация включает по меньшей мере один нуклеотид экзона в пределах геномных координат, выбранных из: chr16:10906853-10906873, chr16:10906757-10906777, chr16:10895302-10895322, chr16:10907539-10907559, chr16:10907730-10907750 и chr16:10895702-10895722.

[0096] В некоторых вариантах осуществления предложена сконструированная клетка в которой снижена или устранена поверхностная экспрессия MHC класса II по сравнению с немодифицированной клеткой, содержащая генетическую модификацию в гене CIITA, при этом генетическая модификация включает по меньшей мере один нуклеотид экзона в пределах геномных координат, выбранных из: chr16:10906853-10906873, chr16:10922444-10922464 и chr16:10916432-10916452.

[0097] В некоторых вариантах осуществления предложена сконструированная клетка, в которой снижена или устранена поверхностная экспрессия MHC класса II по сравнению с немодифицированной клеткой, содержащая генетическую модификацию в гене CIITA, при этом геномная модификация включает по меньшей мере один нуклеотид экзона в пределах геномных координат chr16:10906853-10906873. В некоторых вариантах осуществления предложена сконструированная клетка, в которой снижена или устранена поверхностная экспрессия MHC класса II по сравнению с немодифицированной клеткой, содержащая генетическую модификацию в гене CIITA, при этом геномная модификация включает по меньшей мере один нуклеотид экзона в пределах геномных координат chr16:10922444-10922464. В некоторых вариантах осуществления предложена сконструированная клетка, в которой снижена или устранена поверхностная экспрессия MHC класса II по сравнению с немодифицированной клеткой, содержащая генетическую модификацию в гене CIITA, при этом геномная модификация включает по меньшей мере один нуклеотид экзона в пределах геномных координат chr16:10916432-10916452. В некоторых вариантах осуществления предложена сконструированная клетка, в которой снижена или устранена поверхностная экспрессия MHC класса II по сравнению с немодифицированной клеткой, содержащая генетическую модификацию в гене CIITA,

при этом геномная модификация включает по меньшей мере один нуклеотид экзона в пределах геномных координат chr16:10906757-10906777. В некоторых вариантах осуществления предложена сконструированная клетка, в которой снижена или устранена поверхностная экспрессия MHC класса II по сравнению с немодифицированной клеткой, содержащая генетическую модификацию в гене CIITA, при этом геномная модификация включает по меньшей мере один нуклеотид экзона в пределах геномных координат chr16:10895302-10895322. В некоторых вариантах осуществления предложена сконструированная клетка, в которой снижена или устранена поверхностная экспрессия MHC класса II по сравнению с немодифицированной клеткой, содержащая генетическую модификацию в гене CIITA, при этом геномная модификация включает по меньшей мере один нуклеотид экзона в пределах геномных координат chr16:10907539-10907559. В некоторых вариантах осуществления предложена сконструированная клетка, в которой снижена или устранена поверхностная экспрессия MHC класса II по сравнению с немодифицированной клеткой, содержащая генетическую модификацию в гене CIITA, при этом геномная модификация включает по меньшей мере один нуклеотид экзона в пределах геномных координат chr16:10907730-10907750. В некоторых вариантах осуществления предложена сконструированная клетка, в которой снижена или устранена поверхностная экспрессия MHC класса II по сравнению с немодифицированной клеткой, содержащая генетическую модификацию в гене CIITA, при этом геномная модификация включает по меньшей мере один нуклеотид экзона в пределах геномных координат chr16:10895702-10895722. В некоторых вариантах осуществления предложена сконструированная клетка, в которой снижена или устранена поверхностная экспрессия MHC класса II по сравнению с немодифицированной клеткой, содержащая генетическую модификацию в гене CIITA, при этом геномная модификация включает по меньшей мере один нуклеотид экзона в пределах геномных координат chr16:10907932-10907952. В некоторых вариантах осуществления предложена сконструированная клетка, в которой снижена или устранена поверхностная экспрессия MHC класса II по сравнению с немодифицированной клеткой, содержащая генетическую модификацию в гене CIITA, при этом геномная модификация включает по меньшей мере один нуклеотид экзона в пределах геномных координат chr16:10907476-10907496. В некоторых вариантах осуществления предложена сконструированная клетка, в которой снижена или устранена поверхностная экспрессия MHC класса II по сравнению с немодифицированной клеткой, содержащая генетическую модификацию в гене CIITA, при этом геномная модификация включает по меньшей мере один нуклеотид экзона в пределах геномных координат chr16:10909138-10909158.

[0098] В некоторых вариантах осуществления предложена сконструированная клетка, в которой снижена или устранена поверхностная экспрессия MHC класса II по сравнению с немодифицированной клеткой, содержащая генетическую модификацию в гене CIITA, при этом генетическая модификация включает индел, замену C на T или замену A на G в пределах геномных координат выбранных из: chr16:10902662-10902682,

chr16:10902723-10902743, chr16:10902729-10902749, chr16:10903747-10903767, chr16:10903824-10903844, chr16:10903824-10903844, chr16:10903848-10903868, chr16:10904761-10904781, chr16:10904764-10904784, chr16:10904765-10904785, chr16:10904785-10904805, chr16:10906542-10906562, chr16:10906556-10906576, chr16:10906609-10906629, chr16:10906610-10906630, chr16:10906616-10906636, chr16:10906682-10906702, chr16:10906756-10906776, chr16:10906757-10906777, chr16:10906757-10906777, chr16:10906821-10906841, chr16:10906823-10906843, chr16:10906847-10906867, chr16:10906848-10906868, chr16:10906853-10906873, chr16:10906853-10906873, chr16:10906904-10906924, chr16:10906907-10906927, chr16:10906913-10906933, chr16:10906968-10906988, chr16:10906970-10906990, chr16:10906985-10907005, chr16:10907030-10907050, chr16:10907058-10907078, chr16:10907119-10907139, chr16:10907139-10907159, chr16:10907172-10907192, chr16:10907272-10907292, chr16:10907288-10907308, chr16:10907314-10907334, chr16:10907315-10907335, chr16:10907325-10907345, chr16:10907363-10907383, chr16:10907384-10907404, chr16:10907385-10907405, chr16:10907433-10907453, chr16:10907434-10907454, chr16:10907435-10907455, chr16:10907441-10907461, chr16:10907454-10907474, chr16:10907461-10907481, chr16:10907476-10907496, chr16:10907539-10907559, chr16:10907586-10907606, chr16:10907589-10907609, chr16:10907621-10907641, chr16:10907622-10907642, chr16:10907623-10907643, chr16:10907730-10907750, chr16:10907731-10907751, chr16:10907757-10907777, chr16:10907781-10907801, chr16:10907787-10907807, chr16:10907790-10907810, chr16:10907810-10907830, chr16:10907820-10907840, chr16:10907870-10907890, chr16:10907886-10907906, chr16:10907924-10907944, chr16:10907928-10907948, chr16:10907932-10907952, chr16:10907935-10907955, chr16:10907978-10907998, chr16:10907979-10907999, chr16:10908069-10908089, chr16:10908073-10908093, chr16:10908101-10908121, chr16:10909056-10909076, chr16:10909138-10909158, chr16:10910195-10910215, chr16:10910196-10910216, chr16:10915592-10915612, chr16:10915626-10915646, chr16:10916375-10916395, chr16:10916382-10916402, chr16:10916426-10916446, chr16:10916432-10916452, chr16:10918486-10918506, chr16:10918492-10918512, chr16:10918493-10918513, chr16:10922435-10922455, chr16:10922441-10922461, chr16:10922441-10922461, chr16:10922444-10922464, chr16:10922460-10922480, chr16:10923257-10923277 и chr16:10923265-10923285. В некоторых вариантах осуществления генетическая модификация включает по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 6, по меньшей мере 7, по меньшей мере 8, по меньшей мере 9 или по меньшей мере 10 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат. В некоторых вариантах осуществления генетическая модификация содержит по меньшей мере 5 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат. В некоторых вариантах осуществления генетическая модификация включает по меньшей мере 6, 7, 8, 9 или 10 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат. В некоторых вариантах осуществления генетическая

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

[0099] В некоторых вариантах осуществления предложена сконструированная клетка, в которой снижена или устранена поверхностная экспрессия MHC класса II по сравнению с немодифицированной клеткой, содержащая генетическую модификацию в гене CIITA, при этом генетическая модификация включает индел, замену C на T или замену A на G в геномных координатах, выбранных из: chr16:10916432-10916452, chr16:10922444-10922464, chr16:10907924-10907944, chr16:10906985-10907005, chr16:10908073-10908093, chr16:10907433-10907453, chr16:10907979-10907999, chr16:10907139-10907159, chr16:10922435-10922455, chr16:10907384-10907404, chr16:10907434-10907454, chr16:10907119-10907139, chr16:10907539-10907559, chr16:10907810-10907830, chr16:10907315-10907335, chr16:10916426-10916446, chr16:10909138-10909158, chr16:10908101-10908121, chr16:10907790-10907810, chr16:10907787-10907807, chr16:10907454-10907474, chr16:10895702-10895722, chr16:10902729-10902749, chr16:10918492-10918512, chr16:10907932-10907952, chr16:10907623-10907643, chr16:10907461-10907481, chr16:10902723-10902743, chr16:10907622-10907642, chr16:10922441-10922461, chr16:10902662-10902682, chr16:10915626-10915646, chr16:10915592-10915612, chr16:10907385-10907405, chr16:10907030-10907050, chr16:10907935-10907955, chr16:10906853-10906873, chr16:10906757-10906777, chr16:10907730-10907750 и chr16:10895302-10895322. В некоторых вариантах осуществления генетическая модификация включает по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 6, по меньшей мере 7, по меньшей мере 8, по меньшей мере 9 или по меньшей мере 10 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат. В некоторых вариантах осуществления генетическая модификация содержит по меньшей мере 5 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат. В некоторых вариантах осуществления генетическая модификация включает по меньшей мере 6, 7, 8, 9 или 10 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат. В некоторых вариантах осуществления генетическая модификация включает по меньшей мере одну замену C на T или по меньшей мере одну замену A на G в пределах геномных координат.

[00100] В некоторых вариантах осуществления предложена сконструированная клетка, в которой снижена или устранена поверхностная экспрессия MHC класса II по сравнению с немодифицированной клеткой, содержащая генетическую модификацию в гене CIITA, при этом генетическая модификация включает индел, замену C на T или замену A на G в пределах геномных координат, выбранных из: chr16:10907539-10907559, chr16:10916426-10916446, chr16:10906907-10906927, chr16:10895702-10895722, chr16:10907757-10907777, chr16:10907623-10907643, chr16:10915626-10915646, chr16:10906756-10906776, chr16:10907476-10907496, chr16:10907385-10907405 и chr16:10923265-10923285. В некоторых вариантах осуществления генетическая модификация включает по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по

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

[00101] В некоторых вариантах осуществления предложена сконструированная клетка, в которой снижена или устранена поверхностная экспрессия MHC класса II по сравнению с немодифицированной клеткой, содержащая генетическую модификацию в гене CIITA, при этом генетическая модификация включает индел, замену C на T или замену A на G в пределах геномных координат, выбранных из: chr16:10906853-10906873, chr16:10922444-10922464, chr16:10907924-10907944, chr16:10907315-10907335, chr16:10916432-10916452, chr16:10907932-10907952, chr16:10915626-10915646, chr16:10907586-10907606, chr16:10916426-10916446, chr16:10907476-10907496, chr16:10907787-10907807, chr16:10907979-10907999, и chr16:10906904-10906924 и chr16:10909138-10909158. В некоторых вариантах осуществления генетическая модификация включает по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 6, по меньшей мере 7, по меньшей мере 8, по меньшей мере 9 или по меньшей мере 10 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат. В некоторых вариантах осуществления генетическая модификация содержит по меньшей мере 5 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат. В некоторых вариантах осуществления генетическая модификация включает по меньшей мере 6, 7, 8, 9 или 10 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат. В некоторых вариантах осуществления генетическая модификация включает по меньшей мере одну замену C на T или по меньшей мере одну замену A на G в пределах геномных координат.

[00102] В некоторых вариантах осуществления предложена сконструированная клетка, в которой снижена или устранена поверхностная экспрессия MHC класса II по сравнению с немодифицированной клеткой, содержащая генетическую модификацию в гене CIITA, при этом генетическая модификация включает индел, замену C на T или замену A на G в пределах геномных координат выбранных из: chr16:10895702-10895722, chr16:10916432-10916452, chr16:10907623-10907643, chr16:10907932-10907952, chr16:10906985-10907005, chr16:10915626-10915646, chr16:10907539-10907559, chr16:10916426-10916446, chr16:10907476-10907496, chr16:10907119-10907139, chr16:10907979-10907999 и chr16:10909138-10909158. В некоторых вариантах осуществления генетическая модификация включает по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 6, по меньшей мере 7, по меньшей мере 8, по меньшей мере 9 или по меньшей мере 10 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат. В некоторых вариантах осуществления генетическая

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

[00103] В некоторых вариантах осуществления предложена сконструированная клетка, в которой снижена или устранена поверхностная экспрессия MHC класса II по сравнению с немодифицированной клеткой, содержащая генетическую модификацию в гене CIITA, при этом генетическая модификация включает индел, замену C на T или замену A на G в пределах геномных координат выбранных из: chr16:10906853-10906873, chr16:10906757-10906777, chr16:10895302-10895322, chr16:10907539-10907559, chr16:10907730-10907750 и chr16:10895702-10895722. В некоторых вариантах осуществления генетическая модификация включает по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 6, по меньшей мере 7, по меньшей мере 8, по меньшей мере 9 или по меньшей мере 10 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат. В некоторых вариантах осуществления генетическая модификация содержит по меньшей мере 5 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат. В некоторых вариантах осуществления генетическая модификация включает по меньшей мере 6, 7, 8, 9 или 10 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат. В некоторых вариантах осуществления генетическая модификация включает по меньшей мере одну замену C на T или по меньшей мере одну замену A на G в пределах геномных координат.

[00104] В некоторых вариантах осуществления предложена сконструированная клетка в которой снижена или устранена поверхностная экспрессия MHC класса II по сравнению с немодифицированной клеткой, содержащая генетическую модификацию в гене CIITA, при этом генетическая модификация включает индел, замену C на T или замену A на G в пределах геномных координат, выбранных из: chr16:10906853-10906873, chr16:10922444-10922464 и chr16:10916432-10916452. В некоторых вариантах осуществления генетическая модификация включает по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 6, по меньшей мере 7, по меньшей мере 8, по меньшей мере 9 или по меньшей мере 10 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат. В некоторых вариантах осуществления генетическая модификация содержит по меньшей мере 5 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат. В некоторых вариантах осуществления генетическая модификация включает по меньшей мере 6, 7, 8, 9 или 10 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат. В некоторых вариантах осуществления генетическая модификация включает по меньшей мере одну замену C на T или по меньшей мере одну замену A на G в пределах геномных координат.

[00105] В некоторых вариантах осуществления предложена сконструированная

клетка в которой снижена или устранена поверхностная экспрессия MHC класса II по сравнению с немодифицированной клеткой, содержащая генетическую модификацию в гене CIITA, при этом генетическая модификация включает индел, замену C на T или замену A на G в пределах геномных координат chr16:10906853-10906873. В некоторых вариантах осуществления предложена сконструированная клетка в которой снижена или устранена поверхностная экспрессия MHC класса II по сравнению с немодифицированной клеткой, содержащая генетическую модификацию в гене CIITA, при этом генетическая модификация включает индел, замену C на T или замену A на G в пределах геномных координат chr16:10922444-10922464. В некоторых вариантах осуществления предложена сконструированная клетка в которой снижена или устранена поверхностная экспрессия MHC класса II по сравнению с немодифицированной клеткой, содержащая генетическую модификацию в гене CIITA, при этом генетическая модификация включает индел, замену C на T или замену A на G в пределах геномных координат chr16:10916432-10916452. В некоторых вариантах осуществления предложена сконструированная клетка в которой снижена или устранена поверхностная экспрессия MHC класса II по сравнению с немодифицированной клеткой, содержащая генетическую модификацию в гене CIITA, при этом генетическая модификация включает индел, замену C на T или замену A на G в пределах геномных координат chr16:10906757-10906777. В некоторых вариантах осуществления предложена сконструированная клетка в которой снижена или устранена поверхностная экспрессия MHC класса II по сравнению с немодифицированной клеткой, содержащая генетическую модификацию в гене CIITA, при этом генетическая модификация включает индел, замену C на T или замену A на G в пределах геномных координат chr16:10895302-10895322. В некоторых вариантах осуществления предложена сконструированная клетка в которой снижена или устранена поверхностная экспрессия MHC класса II по сравнению с немодифицированной клеткой, содержащая генетическую модификацию в гене CIITA, при этом генетическая модификация включает индел, замену C на T или замену A на G в пределах геномных координат chr16:10907539-10907559. В некоторых вариантах осуществления предложена сконструированная клетка в которой снижена или устранена поверхностная экспрессия MHC класса II по сравнению с немодифицированной клеткой, содержащая генетическую модификацию в гене CIITA, при этом генетическая модификация включает индел, замену C на T или замену A на G в пределах геномных координат chr16:10907730-10907750. В некоторых вариантах осуществления предложена сконструированная клетка в которой снижена или устранена поверхностная экспрессия MHC класса II по сравнению с немодифицированной клеткой, содержащая генетическую модификацию в гене CIITA, при этом генетическая модификация включает индел, замену C на T или замену A на G в пределах геномных координат chr16:10895702-10895722. В некоторых вариантах осуществления предложена сконструированная клетка в которой снижена или устранена поверхностная экспрессия MHC класса II по сравнению с немодифицированной клеткой, содержащая генетическую модификацию в гене CIITA, при этом генетическая модификация включает индел, замену

C на T или замену A на G в пределах геномных координат chr16:10907932-10907952. В некоторых вариантах осуществления предложена сконструированная клетка в которой снижена или устранена поверхностная экспрессия MHC класса II по сравнению с немодифицированной клеткой, содержащая генетическую модификацию в гене CIITA, при этом генетическая модификация включает индел, замену C на T или замену A на G в пределах геномных координат chr16:10907476-10907496. В некоторых вариантах осуществления предложена сконструированная клетка в которой снижена или устранена поверхностная экспрессия MHC класса II по сравнению с немодифицированной клеткой, содержащая генетическую модификацию в гене CIITA, при этом генетическая модификация включает индел, замену C на T или замену A на G в пределах геномных координат chr16:10909138-10909158. В некоторых вариантах осуществления генетическая модификация включает по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 6, по меньшей мере 7, по меньшей мере 8, по меньшей мере 9 или по меньшей мере 10 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат. В некоторых вариантах осуществления генетическая модификация содержит по меньшей мере 5 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат. В некоторых вариантах осуществления генетическая модификация включает по меньшей мере 6, 7, 8, 9 или 10 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат. В некоторых вариантах осуществления генетическая модификация включает по меньшей мере одну замену C на T или по меньшей мере одну замену A на G в пределах геномных координат.

[00106] В некоторых вариантах осуществления предложена сконструированная клетка, в которой экспрессия MHC класса II снижена или устранена с помощью системы редактирования генов, которая связывается с геномной последовательностью-мишенью CIITA, содержащей по меньшей мере 5 последовательных нуклеотидов в пределах геномных координат, выбранных из: chr16:10902662-10902682, chr16:10902723-10902743, chr16:10902729-10902749, chr16:10903747-10903767, chr16:10903824-10903844, chr16:10903824-10903844, chr16:10903848-10903868, chr16:10904761-10904781, chr16:10904764-10904784, chr16:10904765-10904785, chr16:10904785-10904805, chr16:10906542-10906562, chr16:10906556-10906576, chr16:10906609-10906629, chr16:10906610-10906630, chr16:10906616-10906636, chr16:10906682-10906702, chr16:10906756-10906776, chr16:10906757-10906777, chr16:10906757-10906777, chr16:10906821-10906841, chr16:10906823-10906843, chr16:10906847-10906867, chr16:10906848-10906868, chr16:10906853-10906873, chr16:10906853-10906873, chr16:10906904-10906924, chr16:10906907-10906927, chr16:10906913-10906933, chr16:10906968-10906988, chr16:10906970-10906990, chr16:10906985-10907005, chr16:10907030-10907050, chr16:10907058-10907078, chr16:10907119-10907139, chr16:10907139-10907159, chr16:10907172-10907192, chr16:10907272-10907292, chr16:10907288-10907308, chr16:10907314-10907334, chr16:10907315-10907335, chr16:10907325-10907345, chr16:10907363-10907383, chr16:10907384-10907404, chr16:10907385-10907405, chr16:10907433-10907453, chr16:10907434-10907454,

chr16:10907435-10907455, chr16:10907441-10907461, chr16:10907454-10907474, chr16:10907461-10907481, chr16:10907476-10907496, chr16:10907539-10907559, chr16:10907586-10907606, chr16:10907589-10907609, chr16:10907621-10907641, chr16:10907622-10907642, chr16:10907623-10907643, chr16:10907730-10907750, chr16:10907731-10907751, chr16:10907757-10907777, chr16:10907781-10907801, chr16:10907787-10907807, chr16:10907790-10907810, chr16:10907810-10907830, chr16:10907820-10907840, chr16:10907870-10907890, chr16:10907886-10907906, chr16:10907924-10907944, chr16:10907928-10907948, chr16:10907932-10907952, chr16:10907935-10907955, chr16:10907978-10907998, chr16:10907979-10907999, chr16:10908069-10908089, chr16:10908073-10908093, chr16:10908101-10908121, chr16:10909056-10909076, chr16:10909138-10909158, chr16:10910195-10910215, chr16:10910196-10910216, chr16:10915592-10915612, chr16:10915626-10915646, chr16:10916375-10916395, chr16:10916382-10916402, chr16:10916426-10916446, chr16:10916432-10916452, chr16:10918486-10918506, chr16:10918492-10918512, chr16:10918493-10918513, chr16:10922435-10922455, chr16:10922441-10922461, chr16:10922441-10922461, chr16:10922444-10922464, chr16:10922460-10922480, chr16:10923257-10923277, chr16:10923265-10923285. В некоторых вариантах осуществления геномная целевая последовательность CIITA содержит по меньшей мере 10 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат. В некоторых вариантах осуществления геномная целевая последовательность CIITA содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат. В некоторых вариантах осуществления система редактирования генов содержит РНК-направляемый ДНК-связывающий агент. В некоторых вариантах осуществления РНК-направляемый ДНК-связывающий агент содержит белок Cas9, такой как Cas9 S. pyogenes. В некоторых вариантах осуществления РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, содержит дезаминазу APOBEC3A (A3A) и РНК-направляемую никазу.

[00107] В некоторых вариантах осуществления предложена сконструированная клетка, в которой экспрессия MHC класса II снижена или устранена с помощью системы редактирования генов, которая связывается с геномной последовательностью-мишенью CIITA, содержащей по меньшей мере 5 последовательных нуклеотидов в пределах геномных координат, выбранных из: chr16:10906542-10906562, chr16:10906556-10906576, chr16:10906609-10906629, chr16:10906610-10906630, chr16:10906616-10906636, chr16:10906682-10906702, chr16:10906756-10906776, chr16:10906757-10906777, chr16:10906757-10906777, chr16:10906821-10906841, chr16:10906823-10906843, chr16:10906847-10906867, chr16:10906848-10906868, chr16:10906853-10906873, chr16:10906853-10906873, chr16:10906904-10906924, chr16:10906907-10906927, chr16:10906913-10906933, chr16:10906968-10906988, chr16:10906970-10906990, chr16:10906985-10907005, chr16:10907030-10907050, chr16:10907058-10907078, chr16:10907119-10907139, chr16:10907139-10907159, chr16:10907172-10907192, chr16:10907272-10907292, chr16:10907288-10907308, chr16:10907314-10907334,

chr16:10907315-10907335, chr16:10907325-10907345, chr16:10907363-10907383, chr16:10907384-10907404, chr16:10907385-10907405, chr16:10907433-10907453, chr16:10907434-10907454, chr16:10907435-10907455, chr16:10907441-10907461, chr16:10907454-10907474, chr16:10907461-10907481, chr16:10907476-10907496, chr16:10907539-10907559, chr16:10907586-10907606, chr16:10907589-10907609, chr16:10907621-10907641, chr16:10907622-10907642, chr16:10907623-10907643, chr16:10907730-10907750, chr16:10907731-10907751, chr16:10907757-10907777, chr16:10907781-10907801, chr16:10907787-10907807, chr16:10907790-10907810, chr16:10907810-10907830, chr16:10907820-10907840, chr16:10907870-10907890, chr16:10907886-10907906, chr16:10907924-10907944, chr16:10907928-10907948, chr16:10907932-10907952, chr16:10907935-10907955, chr16:10907978-10907998, chr16:10907979-10907999, chr16:10908069-10908089, chr16:10908073-10908093, chr16:10908101-10908121, chr16:10909056-10909076, chr16:10909138-10909158, chr16:10910195-10910215, chr16:10910196-10910216, chr16:10915592-10915612, chr16:10915626-10915646, chr16:10916375-10916395, chr16:10916382-10916402, chr16:10916426-10916446, chr16:10916432-10916452, chr16:10918486-10918506, chr16:10918492-10918512, chr16:10918493-10918513, chr16:10922435-10922455, chr16:10922441-10922461, chr16:10922441-10922461, chr16:10922444-10922464, chr16:10922460-10922480, chr16:10923257-10923277, chr16:10923265-10923285. В некоторых вариантах осуществления геномная целевая последовательность CIITA содержит по меньшей мере 10 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат. В некоторых вариантах осуществления геномная целевая последовательность CIITA содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат. В некоторых вариантах осуществления система редактирования генов содержит РНК-направляемый ДНК-связывающий агент. В некоторых вариантах осуществления РНК-направляемый ДНК-связывающий агент содержит белок Cas9, такой как Cas9 S. pyogenes. В некоторых вариантах осуществления РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, содержит дезаминазу APOBEC3A (A3A) и РНК-направляемую никазу.

[00108] В некоторых вариантах осуществления предложена сконструированная клетка, в которой экспрессия MHC класса II снижена или устранена с помощью системы редактирования генов, которая связывается с геномной последовательностью-мишенью CIITA, содержащей по меньшей мере 5 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат, выбранных из: chr16:10906542-10906562, chr16:10906556-10906576, chr16:10906609-10906629, chr16:10906610-10906630, chr16:10906616-10906636, chr16:10906682-10906702, chr16:10906756-10906776, chr16:10906757-10906777, chr16:10906757-10906777, chr16:10906821-10906841, chr16:10906823-10906843, chr16:10906847-10906867, chr16:10906848-10906868, chr16:10906853-10906873, chr16:10906853-10906873, chr16:10906904-10906924, chr16:10906907-10906927, chr16:10906913-10906933, chr16:10906968-10906988, chr16:10906970-10906990, chr16:10906985-10907005, chr16:10907030-10907050, chr16:10907058-10907078,

chr16:10907119-10907139, chr16:10907139-10907159, chr16:10907172-10907192, chr16:10907272-10907292, chr16:10907288-10907308, chr16:10907314-10907334, chr16:10907315-10907335, chr16:10907325-10907345, chr16:10907363-10907383, chr16:10907384-10907404, chr16:10907385-10907405, chr16:10907433-10907453, chr16:10907434-10907454, chr16:10907435-10907455, chr16:10907441-10907461, chr16:10907454-10907474, chr16:10907461-10907481, chr16:10907476-10907496, chr16:10907539-10907559, chr16:10907586-10907606, chr16:10907589-10907609, chr16:10907621-10907641, chr16:10907622-10907642, chr16:10907623-10907643, chr16:10907730-10907750, chr16:10907731-10907751, chr16:10907757-10907777, chr16:10907781-10907801, chr16:10907787-10907807, chr16:10907790-10907810, chr16:10907810-10907830, chr16:10907820-10907840, chr16:10907870-10907890, chr16:10907886-10907906, chr16:10907924-10907944, chr16:10907928-10907948, chr16:10907932-10907952, chr16:10907935-10907955, chr16:10907978-10907998, chr16:10907979-10907999, chr16:10908069-10908089, chr16:10908073-10908093, chr16:10908101-10908121. В некоторых вариантах осуществления геномная целевая последовательность CIITA содержит по меньшей мере 10 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат. В некоторых вариантах осуществления геномная целевая последовательность CIITA содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат. В некоторых вариантах осуществления система редактирования генов содержит РНК-направляемый ДНК-связывающий агент. В некоторых вариантах осуществления РНК-направляемый ДНК-связывающий агент содержит белок Cas9, такой как Cas9 S. pyogenes. В некоторых вариантах осуществления РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, содержит дезаминазу APOBEC3A (A3A) и РНК-направляемую никазу.

[00109] В некоторых вариантах осуществления предложена сконструированная клетка, в которой экспрессия MHC класса II снижена или устранена с помощью системы редактирования генов, которая связывается с геномной последовательностью-мишенью CIITA, содержащей по меньшей мере 5 последовательных нуклеотидов в пределах геномных координат, выбранных из: chr16:10916432-10916452, chr16:10922444-10922464, chr16:10907924-10907944, chr16:10906985-10907005, chr16:10908073-10908093, chr16:10907433-10907453, chr16:10907979-10907999, chr16:10907139-10907159, chr16:10922435-10922455, chr16:10907384-10907404, chr16:10907434-10907454, chr16:10907119-10907139, chr16:10907539-10907559, chr16:10907810-10907830, chr16:10907315-10907335, chr16:10916426-10916446, chr16:10909138-10909158, chr16:10908101-10908121, chr16:10907790-10907810, chr16:10907787-10907807, chr16:10907454-10907474, chr16:10895702-10895722, chr16:10902729-10902749, chr16:10918492-10918512, chr16:10907932-10907952, chr16:10907623-10907643, chr16:10907461-10907481, chr16:10902723-10902743, chr16:10907622-10907642, chr16:10922441-10922461, chr16:10902662-10902682, chr16:10915626-10915646, chr16:10915592-10915612, chr16:10907385-10907405, chr16:10907030-10907050,

chr16:10907935-10907955, chr16:10906853-10906873, chr16:10906757-10906777, chr16:10907730-10907750 и chr16:10895302-10895322. В некоторых вариантах осуществления геномная целевая последовательность CIITA содержит по меньшей мере 10 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат. В некоторых вариантах осуществления геномная целевая последовательность CIITA содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат. В некоторых вариантах осуществления система редактирования генов содержит РНК-направляемый ДНК-связывающий агент. В некоторых вариантах осуществления РНК-направляемый ДНК-связывающий агент содержит белок Cas9, такой как Cas9 S. pyogenes. В некоторых вариантах осуществления РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, содержит дезаминазу APOBEC3A (A3A) и РНК-направляемую никазу.

[00110] В некоторых вариантах осуществления предложена сконструированная клетка, в которой экспрессия MHC класса II снижена или устранена с помощью системы редактирования генов, которая связывается с геномной последовательностью-мишенью CIITA, содержащей по меньшей мере 5 последовательных нуклеотидов в пределах геномных координат, выбранных из: chr16:10907539-10907559, chr16:10916426-10916446, chr16:10906907-10906927, chr16:10895702-10895722, chr16:10907757-10907777, chr16:10907623-10907643, chr16:10915626-10915646, chr16:10906756-10906776, chr16:10907476-10907496, chr16:10907385-10907405 и chr16:10923265-10923285. В некоторых вариантах осуществления геномная целевая последовательность CIITA содержит по меньшей мере 10 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат. В некоторых вариантах осуществления геномная целевая последовательность CIITA содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат. В некоторых вариантах осуществления система редактирования генов содержит РНК-направляемый ДНК-связывающий агент. В некоторых вариантах осуществления РНК-направляемый ДНК-связывающий агент содержит белок Cas9, такой как Cas9 S. pyogenes.

[00111] В некоторых вариантах осуществления предложена сконструированная клетка, в которой экспрессия MHC класса II снижена или устранена с помощью системы редактирования генов, которая связывается с геномной последовательностью-мишенью CIITA, содержащей по меньшей мере 5 последовательных нуклеотидов в пределах геномных координат, выбранных из: chr16:10907539-10907559, chr16:10916426-10916446, chr16:10906907-10906927, chr16:10895702-10895722, chr16:10907757-10907777, chr16:10907623-10907643, chr16:10915626-10915646, chr16:10906756-10906776, chr16:10907476-10907496, chr16:10907385-10907405 и chr16:10923265-10923285. В некоторых вариантах осуществления геномная целевая последовательность CIITA содержит по меньшей мере 10 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат. В некоторых вариантах осуществления геномная целевая последовательность CIITA содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат. В некоторых вариантах осуществления система редактирования генов содержит РНК-направляемый ДНК-связывающий агент. В некоторых вариантах осуществления РНК-

направляемый ДНК-связывающий агент, содержит дезаминазу APOBEC3A (A3A) и РНК-направляемую никазу.

[00112] В некоторых вариантах осуществления предложена сконструированная клетка, в которой экспрессия MHC класса II снижена или устранена с помощью системы редактирования генов, которая связывается с геномной целевой последовательностью CIITA, содержащей по меньшей мере 5 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат, выбранных из: chr16:10906853-10906873, chr16:10922444-10922464, chr16:10907924-10907944, chr16:10907315-10907335, chr16:10916432-10916452, chr16:10907932-10907952, chr16:10915626-10915646, chr16:10907586-10907606, chr16:10916426-10916446, chr16:10907476-10907496, chr16:10907787-10907807, chr16:10907979-10907999, chr16:10906904-10906924 и chr16:10909138-10909158. В некоторых вариантах осуществления геномная целевая последовательность CIITA содержит по меньшей мере 10 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат. В некоторых вариантах осуществления геномная целевая последовательность CIITA содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат. В некоторых вариантах осуществления система редактирования генов содержит РНК-направляемый ДНК-связывающий агент. В некоторых вариантах осуществления РНК-направляемый ДНК-связывающий агент содержит белок Cas9, такой как Cas9 S. pyogenes.

[00113] В некоторых вариантах осуществления предложена сконструированная клетка, в которой экспрессия MHC класса II снижена или устранена с помощью системы редактирования генов, которая связывается с геномной последовательностью-мишенью CIITA, содержащей по меньшей мере 5 последовательных нуклеотидов в пределах геномных координат, выбранных из: chr16:10895702-10895722, chr16:10916432-10916452, chr16:10907623-10907643, chr16:10907932-10907952, chr16:10906985-10907005, chr16:10915626-10915646, chr16:10907539-10907559, chr16:10916426-10916446, chr16:10907476-10907496, chr16:10907119-10907139, chr16:10907979-10907999 и chr16:10909138-10909158. В некоторых вариантах осуществления геномная целевая последовательность CIITA содержит по меньшей мере 10 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат. В некоторых вариантах осуществления геномная целевая последовательность CIITA содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат. В некоторых вариантах осуществления система редактирования генов содержит РНК-направляемый ДНК-связывающий агент. В некоторых вариантах осуществления РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, содержит дезаминазу APOBEC3A (A3A) и РНК-направляемую никазу.

[00114] В некоторых вариантах осуществления предложена сконструированная клетка, в которой экспрессия MHC класса II снижена или устранена с помощью системы редактирования генов, которая связывается с геномной последовательностью-мишенью CIITA, содержащей по меньшей мере 5 последовательных нуклеотидов в пределах геномных координат, выбранных из: chr16:10906853-10906873, chr16:10906757-10906777, chr16:10895302-10895322, chr16:10907539-10907559, chr16:10907730-10907750 и

chr16:10895702-10895722. В некоторых вариантах осуществления геномная целевая последовательность CIITA содержит по меньшей мере 10 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат. В некоторых вариантах осуществления геномная целевая последовательность CIITA содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат. В некоторых вариантах осуществления система редактирования генов содержит РНК-направляемый ДНК-связывающий агент. В некоторых вариантах осуществления РНК-направляемый ДНК-связывающий агент содержит белок Cas9, такой как Cas9 S. pyogenes. В некоторых вариантах осуществления РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, содержит дезаминазу APOBEC3A (A3A) и РНК-направляемую никазу.

[00115] В некоторых вариантах осуществления предложена сконструированная клетка, в которой экспрессия MHC класса II снижена или устранена с помощью системы редактирования генов, которая связывается с геномной последовательностью-мишенью CIITA, содержащей по меньшей мере 5 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат, выбранных из: chr16:10906853-10906873, chr16:10922444-10922464 и chr16:10916432-10916452. В некоторых вариантах осуществления геномная целевая последовательность CIITA содержит по меньшей мере 10 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат. В некоторых вариантах осуществления геномная целевая последовательность CIITA содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат. В некоторых вариантах осуществления система редактирования генов содержит РНК-направляемый ДНК-связывающий агент. В некоторых вариантах осуществления РНК-направляемый ДНК-связывающий агент содержит белок Cas9, такой как Cas9 S. pyogenes.

[00116] В некоторых вариантах осуществления предложена сконструированная клетка, в которой экспрессия MHC класса II снижена или устранена с помощью системы редактирования генов, которая связывается с геномной последовательностью-мишенью CIITA, содержащей по меньшей мере 5 последовательных нуклеотидов в пределах геномных координат chr16:10906853-10906873. В некоторых вариантах осуществления предложена сконструированная клетка, в которой экспрессия MHC класса II снижена или устранена с помощью системы редактирования генов, которая связывается с геномной последовательностью-мишенью CIITA, содержащей по меньшей мере 5 последовательных нуклеотидов в пределах геномных координат chr16:10922444-10922464. В некоторых вариантах осуществления предложена сконструированная клетка, в которой экспрессия MHC класса II снижена или устранена с помощью системы редактирования генов, которая связывается с геномной последовательностью-мишенью CIITA, содержащей по меньшей мере 5 последовательных нуклеотидов в пределах геномных координат chr16:10906757-10906777. В некоторых вариантах осуществления предложена сконструированная клетка, в которой экспрессия MHC класса II снижена или устранена с помощью системы редактирования генов, которая связывается с геномной последовательностью-мишенью CIITA, содержащей по меньшей мере 5 последовательных нуклеотидов в пределах

геномных координат chr16:10895302-10895322. В некоторых вариантах осуществления предложена сконструированная клетка, в которой экспрессия MHC класса II снижена или устранена с помощью системы редактирования генов, которая связывается с геномной последовательностью-мишенью CIITA, содержащей по меньшей мере 5 последовательных нуклеотидов в пределах геномных координат chr16:10907539-10907559. В некоторых вариантах осуществления предложена сконструированная клетка, в которой экспрессия MHC класса II снижена или устранена с помощью системы редактирования генов, которая связывается с геномной последовательностью-мишенью CIITA, содержащей по меньшей мере 5 последовательных нуклеотидов в пределах геномных координат chr16:10907730-10907750. В некоторых вариантах осуществления предложена сконструированная клетка, в которой экспрессия MHC класса II снижена или устранена с помощью системы редактирования генов, которая связывается с геномной последовательностью-мишенью CIITA, содержащей по меньшей мере 5 последовательных нуклеотидов в пределах геномных координат chr16:10895702-10895722. В некоторых вариантах осуществления предложена сконструированная клетка, в которой экспрессия MHC класса II снижена или устранена с помощью системы редактирования генов, которая связывается с геномной последовательностью-мишенью CIITA, содержащей по меньшей мере 5 последовательных нуклеотидов в пределах геномных координат chr16:10907932-10907952. В некоторых вариантах осуществления предложена сконструированная клетка, в которой экспрессия MHC класса II снижена или устранена с помощью системы редактирования генов, которая связывается с геномной последовательностью-мишенью CIITA, содержащей по меньшей мере 5 последовательных нуклеотидов в пределах геномных координат chr16:10907476-10907496. В некоторых вариантах осуществления предложена сконструированная клетка, в которой экспрессия MHC класса II снижена или устранена с помощью системы редактирования генов, которая связывается с геномной последовательностью-мишенью CIITA, содержащей по меньшей мере 5 последовательных нуклеотидов в пределах геномных координат chr16:10909138-10909158. В некоторых вариантах осуществления геномная целевая последовательность CIITA содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат. В некоторых вариантах осуществления система редактирования генов содержит РНК-направляемый ДНК-связывающий агент. В некоторых вариантах осуществления РНК-направляемый ДНК-связывающий агент содержит белок Cas9, такой как Cas9 S. pyogenes. В некоторых вариантах осуществления РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, содержит дезаминазу APOBEC3A (A3A) и РНК-направляемую никазу.

[00117] В некоторых вариантах осуществления предложена сконструированная клетка, в которой снижена или устранена поверхностная экспрессия MHC класса II по сравнению с немодифицированной клеткой, содержащая генетическую модификацию гена CIITA, как описано в данном документе, и при этом в клетке дополнительно снижена или устранена поверхностная экспрессия HLA-A. В некоторых вариантах осуществления сконструированная клетка содержит генетическую модификацию гена HLA-A. В

некоторых вариантах осуществления сконструированная клетка содержит генетическую модификацию в гене HLA-A, при этом клетка является гомозиготной по HLA-B и гомозиготной по HLA-C. В некоторых вариантах осуществления сконструированная клетка содержит генетическую модификацию, устраняющую экспрессию белка MHC класса I на поверхности сконструированной клетки.

[00118] Сконструированные клетки человека, описанные в настоящем документе, могут содержать генетическую модификацию в любом аллеле HLA-A гена HLA-A. Ген HLA расположен в хромосоме 6 в геномной области, называемой суперлокусом HLA; сотни аллелей HLA-A были зарегистрированы в данной области техники (*см., например,* Shiina et al., Nature 54:15-39 (2009). Последовательности аллелей HLA-A доступны в данной области техники (*см., например*, базу данных IPD-IMGT/HLA для поиска последовательностей конкретных аллелей HLA-A https://www.ebi.ac.uk/ipd/imgt/hla/allele.html).

[00119] В любом из вышеуказанных вариантов осуществления предложена сконструированная клетка, в которой снижена или устранена поверхностная экспрессия MHC класса II по сравнению с немодифицированной клеткой, содержащая генетическую модификацию в гене CIITA, при этом модификация включает по меньшей мере один нуклеотид экзона в пределах геномных координат chr16: 10902662-chr16:10923285, и дополнительно содержит генетическую модификацию в гене HLA-A, и при этом генетическая модификация в гене HLA-A включает по меньшей мере один нуклеотид в пределах геномных координат, выбранных из: chr6:29942854-chr6:29942913 и chr6:29943518-chr6: 29943619. В некоторых вариантах осуществления клетка содержит генетическую модификацию в гене HLA-A, и при этом генетическая модификация в гене HLA-A включает по меньшей мере один нуклеотид в пределах геномных координат, выбранных из: chr6:29942864-chr6: 29942903. В некоторых вариантах осуществления клетка содержит генетическую модификацию в гене HLA-A, при этом генетическая модификация в гене HLA-A включает по меньшей мере один нуклеотид в пределах геномных координат, выбранных из: от chr6:29943528 до chr6:29943609. В некоторых вариантах осуществления клетка содержит генетическую модификацию в гене HLA-A, и при этом генетическая модификация в гене HLA-A включает по меньшей мере один нуклеотид в пределах геномных координат, выбранных из: chr6:29942864-29942884; chr6:29942868-29942888; chr6:29942876-29942896; chr6:29942877-29942897; chr6:29942883-29942903; chr6:29943126-29943146; chr6:29943528-29943548; chr6:29943529-29943549; chr6:29943530-29943550; chr6:29943537-29943557; chr6:29943549-29943569; chr6:29943589-29943609 и chr6:29944026-29944046. В некоторых вариантах осуществления клетка содержит генетическую модификацию в гене HLA-A, и где генетическая модификация в гене HLA-A включает индел, замену C на T или замену A на G в пределах геномных координат, выбранных из: chr6:29942864-29942884; chr6:29942868-29942888; chr6:29942876-29942896; chr6:29942877-29942897; chr6:29942883-29942903; chr6:29943126-29943146; chr6:29943528-29943548;

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

[00120] В некоторых вариантах осуществления предложена сконструированная клетка, в которой снижена или устранена поверхностная экспрессия MHC класса II по сравнению с немодифицированной клеткой, содержащая генетическую модификацию в гене CIITA, при этом генетическая модификация включает по меньшей мере один нуклеотид экзона в пределах геномных координат chr16:10906542-chr16:10923285, и при этом клетка дополнительно содержит генетическую модификацию в гене HLA-A, и при это генетическая модификация в гене HLA-A включает по меньшей мере один нуклеотид в пределах геномных координат, выбранных из: chr6:29942854-chr6:29942913 и chr6:29943518 -ch6: 29943619. В некоторых вариантах осуществления клетка содержит генетическую модификацию в гене HLA-A, и при этом генетическая модификация в гене HLA-A включает по меньшей мере один нуклеотид в пределах геномных координат, выбранных из: chr6:29942864-chr6: 29942903. В некоторых вариантах осуществления клетка содержит генетическую модификацию в гене HLA-A, при этом генетическая модификация в гене HLA-A включает по меньшей мере один нуклеотид в пределах геномных координат, выбранных из: от chr6:29943528 до chr6:29943609. В некоторых вариантах осуществления клетка содержит генетическую модификацию в гене HLA-A, и при этом генетическая модификация в гене HLA-A включает по меньшей мере один нуклеотид в пределах геномных координат, выбранных из: chr6:29942864-29942884; chr6:29942868-29942888; chr6:29942876-29942896; chr6:29942877-29942897; chr6:29942883-29942903; chr6:29943126-29943146; chr6:29943528-29943548; chr6:29943529-29943549; chr6:29943530-29943550; chr6:29943537-29943557; chr6:29943549-29943569; chr6:29943589-29943609 и chr6:29944026-29944046. В некоторых вариантах осуществления клетка содержит генетическую модификацию в гене HLA-A, и где генетическая модификация в гене HLA-A включает индел, замену C на T или замену A на G в пределах геномных координат, выбранных из: chr6:29942864-29942884; chr6:29942868-29942888; chr6:29942876-29942896; chr6:29942877-29942897; chr6:29942883-29942903; chr6:29943126-29943146; chr6:29943528-29943548; chr6:29943529-29943549; chr6:29943530-29943550; chr6:29943537-29943557; chr6:29943549-29943569; chr6:29943589-29943609 и chr6:29944026-29944046. В некоторых

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

[00121] В некоторых вариантах осуществления предложена сконструированная клетка, в которой снижена или устранена поверхностная экспрессия MHC класса II по сравнению с немодифицированной клеткой, содержащая генетическую модификацию в гене CIITA, при этом генетическая модификация включает по меньшей мере один нуклеотид экзона в пределах геномных координат chr16:10906542-chr16:10908121, и при этом клетка дополнительно содержит генетическую модификацию в гене HLA-A, и при это генетическая модификация в гене HLA-A включает по меньшей мере один нуклеотид в пределах геномных координат, выбранных из: chr6:29942854-chr6:29942913 и chr6:29943518-chr6: 29943619. В некоторых вариантах осуществления клетка содержит генетическую модификацию в гене HLA-A, и при этом генетическая модификация в гене HLA-A включает по меньшей мере один нуклеотид в пределах геномных координат, выбранных из: chr6:29942864-chr6: 29942903. В некоторых вариантах осуществления клетка содержит генетическую модификацию в гене HLA-A, при этом генетическая модификация в гене HLA-A включает по меньшей мере один нуклеотид в пределах геномных координат, выбранных из: от chr6:29943528 до chr6:29943609. В некоторых вариантах осуществления клетка содержит генетическую модификацию в гене HLA-A, и при этом генетическая модификация в гене HLA-A включает по меньшей мере один нуклеотид в пределах геномных координат, выбранных из: chr6:29942864-29942884; chr6:29942868-29942888; chr6:29942876-29942896; chr6:29942877-29942897; chr6:29942883-29942903; chr6:29943126-29943146; chr6:29943528-29943548; chr6:29943529-29943549; chr6:29943530-29943550; chr6:29943537-29943557; chr6:29943549-29943569; chr6:29943589-29943609 и chr6:29944026-29944046. В некоторых вариантах осуществления клетка содержит генетическую модификацию в гене HLA-A, и где генетическая модификация в гене HLA-A включает индел, замену C на T или замену A на G в пределах геномных координат, выбранных из: chr6:29942864-29942884; chr6:29942868-29942888; chr6:29942876-29942896; chr6:29942877-29942897; chr6:29942883-29942903; chr6:29943126-29943146; chr6:29943528-29943548; chr6:29943529-29943549; chr6:29943530-29943550; chr6:29943537-29943557; chr6:29943549-29943569; chr6:29943589-29943609 и chr6:29944026-29944046. В некоторых вариантах осуществления экспрессия HLA-A в клетке снижена или устранена с помощью системы редактирования генов, которая связывается с геномной целевой

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

[00122] В некоторых вариантах осуществления предложена сконструированная клетка, в которой снижена или устранена поверхностная экспрессия MHC класса II по сравнению с немодифицированной клеткой, содержащая генетическую модификацию в гене CIITA, при этом генетическая модификация включает по меньшей мере один нуклеотид экзона в пределах геномных координат, выбранных из: chr16:10916432-10916452, chr16:10922444-10922464, chr16:10907924-10907944, chr16:10906985-10907005, chr16:10908073-10908093, chr16:10907433-10907453, chr16:10907979-10907999, chr16:10907139-10907159, chr16:10922435-10922455, chr16:10907384-10907404, chr16:10907434-10907454, chr16:10907119-10907139, chr16:10907539-10907559, chr16:10907810-10907830, chr16:10907315-10907335, chr16:10916426-10916446, chr16:10909138-10909158, chr16:10908101-10908121, chr16:10907790-10907810, chr16:10907787-10907807, chr16:10907454-10907474, chr16:10895702-10895722, chr16:10902729-10902749, chr16:10918492-10918512, chr16:10907932-10907952, chr16:10907623-10907643, chr16:10907461-10907481, chr16:10902723-10902743, chr16:10907622-10907642, chr16:10922441-10922461, chr16:10902662-10902682, chr16:10915626-10915646, chr16:10915592-10915612, chr16:10907385-10907405, chr16:10907030-10907050, chr16:10907935-10907955, chr16:10906853-10906873, chr16:10906757-10906777, chr16:10907730-10907750 и chr16:10895302-10895322, и при этом клетка дополнительно содержит генетическую модификацию в гене HLA-A, и при это генетическая модификация в гене HLA-A включает по меньшей мере один нуклеотид в пределах геномных координат, выбранных из: chr6:29942854-chr6:29942913 и chr6:29943518-chr6: 29943619. В некоторых вариантах осуществления клетка содержит генетическую модификацию в гене HLA-A, и при этом генетическая модификация в гене HLA-A включает по меньшей мере один нуклеотид в пределах геномных координат, выбранных из: chr6:29942864-chr6: 29942903. В некоторых вариантах осуществления клетка содержит генетическую модификацию в гене HLA-A, при этом генетическая модификация в гене HLA-A включает по меньшей мере один нуклеотид в пределах геномных координат, выбранных из: от chr6:29943528 до chr6:29943609. В некоторых вариантах осуществления клетка содержит генетическую модификацию в гене HLA-A, и при этом генетическая модификация в гене HLA-A включает по меньшей мере один нуклеотид в пределах геномных координат, выбранных из: chr6:29942864-29942884; chr6:29942868-29942888; chr6:29942876-29942896; chr6:29942877-29942897; chr6:29942883-29942903; chr6:29943126-29943146; chr6:29943528-29943548;

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

[00123] В некоторых вариантах осуществления предложена сконструированная клетка, в которой снижена или устранена поверхностная экспрессия MHC класса II по сравнению с немодифицированной клеткой, содержащая генетическую модификацию в гене CIITA, при этом генетическая модификация включает по меньшей мере один нуклеотид экзона в пределах геномных координат, выбранных из: chr16:10907539-10907559, chr16:10916426-10916446, chr16:10906907-10906927, chr16:10895702-10895722, chr16:10907757-10907777, chr16:10907623-10907643, chr16:10915626-10915646, chr16:10906756-10906776, chr16:10907476-10907496, chr16:10907385-10907405 и chr16:10923265-10923285, и при этом клетка дополнительно содержит генетическую модификацию в гене HLA-A, и при это генетическая модификация в гене HLA-A включает по меньшей мере один нуклеотид в пределах геномных координат, выбранных из: от chr6:29942854 до chr6:29942913 и от chr6:29943518 до ch6: 29943619. В некоторых вариантах осуществления клетка содержит генетическую модификацию в гене HLA-A, и при этом генетическая модификация в гене HLA-A включает по меньшей мере один нуклеотид в пределах геномных координат, выбранных из: chr6:29942864-chr6: 29942903. В некоторых вариантах осуществления клетка содержит генетическую модификацию в гене HLA-A, при этом генетическая модификация в гене HLA-A включает по меньшей мере один нуклеотид в пределах геномных координат, выбранных из: от chr6:29943528 до chr6:29943609. В некоторых вариантах осуществления клетка содержит генетическую модификацию в гене HLA-A, и при этом генетическая модификация в гене HLA-A включает по меньшей мере один нуклеотид в пределах геномных координат, выбранных из: chr6:29942864-29942884; chr6:29942868-29942888; chr6:29942876-29942896;

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

[00124] В некоторых вариантах осуществления предложена сконструированная клетка, в которой снижена или устранена поверхностная экспрессия MHC класса II по сравнению с немодифицированной клеткой, содержащая генетическую модификацию в гене CIITA, при этом генетическая модификация включает по меньшей мере один нуклеотид экзона в пределах геномных координат, выбранных из: chr16:10906853-10906873, chr16:10906757-10906777, chr16:10895302-10895322, chr16:10907539-10907559, chr16:10907730-10907750, chr16:10895702-10895722, и при этом клетка дополнительно содержит генетическую модификацию в гене HLA-A, и при это генетическая модификация в гене HLA-A включает по меньшей мере один нуклеотид в пределах геномных координат, выбранных из: от chr6:29942854 до chr6:29942913 и от chr6:29943518 до ch6: 29943619. В некоторых вариантах осуществления клетка содержит генетическую модификацию в гене HLA-A, и при этом генетическая модификация в гене HLA-A включает по меньшей мере один нуклеотид в пределах геномных координат, выбранных из: chr6:29942864-chr6: 29942903. В некоторых вариантах осуществления клетка содержит генетическую модификацию в гене HLA-A, при этом генетическая модификация в гене HLA-A включает по меньшей мере один нуклеотид в пределах геномных координат, выбранных из: от chr6:29943528 до chr6:29943609. В некоторых вариантах осуществления клетка содержит генетическую модификацию в гене HLA-A, и при этом генетическая модификация в гене HLA-A включает по меньшей мере один нуклеотид в пределах геномных координат, выбранных из: chr6:29942864-29942884;

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

[00125] В некоторых вариантах осуществления предложена сконструированная клетка, в которой снижена или устранена поверхностная экспрессия MHC класса II по сравнению с немодифицированной клеткой, содержащая генетическую модификацию в гене CIITA, как описано в настоящем документе, и при этом клетка дополнительно имеет сниженную или устраненную поверхностную экспрессию MHC класса I. В некоторых вариантах осуществления сконструированная клетка содержит генетическую модификацию гена бета-2-микроглобулина (B2M). В некоторых вариантах осуществления сконструированная клетка содержит генетическую модификацию гена бета-2-микроглобулина (B2M) и вставку экзогенной нуклеиновой кислоты, кодирующей молекулу ингибитора NK-клеток. В некоторых вариантах осуществления сконструированная клетка содержит генетическую модификацию, которая устраняет экспрессию белка MHC класса I на поверхности сконструированной клетки.

[00126] В некоторых вариантах осуществления предложена сконструированная клетка, в которой снижена или устранена поверхностная экспрессия MHC класса II по сравнению с немодифицированной клеткой, содержащая генетическую модификацию в гене CIITA, при этом модификация включает по меньшей мере один нуклеотид экзона в пределах геномных координат chr16: 10902662-chr16:10923285, и при этом клетка дополнительно содержит экзогенную нуклеиновую кислоту. В некоторых вариантах осуществления экзогенная нуклеиновая кислота кодирует нацеливающий рецептор, который экспрессируется на поверхности сконструированной клетки. В некоторых

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

[00127] В некоторых вариантах осуществления предложена сконструированная клетка, в которой снижена или устранена поверхностная экспрессия MHC класса II по сравнению с немодифицированной клеткой, содержащая генетическую модификацию в гене CIITA, при этом модификация включает по меньшей мере один нуклеотид экзона в пределах геномных координат chr16: 10902662-chr16:10923285, при этом в клетке дополнительно снижена или устранена поверхностная экспрессия MHC класса I, и при этом клетка дополнительно содержит экзогенную нуклеиновую кислоту. В некоторых вариантах осуществления сконструированная клетка содержит генетическую модификацию в гене бета-2-микроглобулина (B2M). В некоторых вариантах осуществления сконструированная клетка содержит генетическую модификацию, которая снижает экспрессию белка MHC класса I на поверхности сконструированной клетки. В некоторых вариантах осуществления экзогенная нуклеиновая кислота кодирует нацеливающий рецептор, который экспрессируется на поверхности сконструированной клетки. В некоторых вариантах осуществления нацеливающий рецептор представляет собой химерный антигенный рецептор (CAR). В некоторых вариантах осуществления нацеливающий рецептор представляет собой универсальный CAR (UniCAR). В некоторых вариантах осуществления нацеливающий рецептор представляет собой Т-клеточный рецептор (TCR). В некоторых вариантах осуществления нацеливающий рецептор

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

[00128] В некоторых вариантах осуществления предложена сконструированная клетка, в которой снижена или устранена поверхностная экспрессия MHC класса II по сравнению с немодифицированной клеткой, содержащая генетическую модификацию в гене CIITA, при этом модификация включает по меньшей мере один нуклеотид экзона в пределах геномных координат chr16: 10902662-chr16:10923285, при этом в клетке дополнительно снижена или устранена поверхностная экспрессия HLA-A, и при этом клетка дополнительно содержит экзогенную нуклеиновую кислоту. В некоторых вариантах осуществления сконструированная клетка содержит генетическую модификацию в гене HLA-A. В некоторых вариантах осуществления сконструированная клетка содержит генетическую модификацию, которая снижает экспрессию белка HLA-A на поверхности сконструированной клетки. В некоторых вариантах осуществления экзогенная нуклеиновая кислота кодирует нацеливающий рецептор, который экспрессируется на поверхности сконструированной клетки. В некоторых вариантах осуществления нацеливающий рецептор представляет собой химерный антигенный рецептор (CAR). В некоторых вариантах осуществления нацеливающий рецептор представляет собой универсальный CAR (UniCAR). В некоторых вариантах осуществления нацеливающий рецептор представляет собой Т-клеточный рецептор (TCR). В некоторых вариантах осуществления нацеливающий рецептор представляет собой TCR WT1. В некоторых вариантах осуществления нацеливающий рецептор представляет собой гибрид CAR/TCR. В некоторых вариантах осуществления нацеливающий рецептор содержит домен распознавания антигена (например, домен распознавания ракового антигена и субъединицу TCR). В некоторых вариантах осуществления нацеливающий рецептор представляет собой цитокиновый рецептор. В

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

[00129] В некоторых вариантах осуществления предложена сконструированная клетка, в которой снижена или устранена поверхностная экспрессия MHC класса II по сравнению с немодифицированной клеткой, содержащая генетическую модификацию в гене CIITA, при этом модификация включает по меньшей мере один нуклеотид экзона в пределах геномных координат chr16: 10902662-chr16:10923285, и при этом в клетке дополнительно снижена или устранена экспрессия эндогенного белка TCR по сравнению с немодифицированной клеткой. В некоторых вариантах осуществления предложена сконструированная клетка, в которой снижена или устранена поверхностная экспрессия MHC класса II по сравнению с немодифицированной клеткой, содержащая генетическую модификацию в гене CIITA, при этом модификация включает по меньшей мере один нуклеотид экзона в пределах геномных координат chr16: 10902662-chr16:10923285, и при этом клетка дополнительно содержит экзогенную нуклеиновую кислоту и, дополнительно имеет сниженную или устраненную экспрессию эндогенного белка TCR по сравнению с немодифицированной клеткой. В некоторых вариантах осуществления предложена сконструированная клетка, в которой снижена или устранена поверхностная экспрессия MHC класса II по сравнению с немодифицированной клеткой, содержащая генетическую модификацию в гене CIITA, при этом модификация включает по меньшей мере один нуклеотид экзона в пределах геномных координат chr16: 10902662-chr16:10923285, и при этом в клетке дополнительно снижена или устранена поверхностная экспрессия MHC класса I, и при этом в клетке дополнительно снижена или устранена экспрессия эндогенного белка TCR по сравнению с немодифицированной клеткой.

[00130] В некоторых вариантах осуществления предложена сконструированная клетка, в которой снижена или устранена поверхностная экспрессия MHC класса II по сравнению с немодифицированной клеткой, содержащая генетическую модификацию в гене CIITA, при этом модификация включает по меньшей мере один нуклеотид экзона в пределах геномных координат chr16: 10902662-chr16:10923285, и при этом клетка дополнительно содержит экзогенную нуклеиновую кислоту, и при этом в клетке дополнительно снижена или устранена поверхностная экспрессия MHC класса I, и при

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

[00131] В некоторых вариантах осуществления предложена сконструированная клетка, в которой снижена или устранена поверхностная экспрессия MHC класса II по сравнению с немодифицированной клеткой, содержащая генетическую модификацию в гене CIITA, при этом модификация включает по меньшей мере один нуклеотид экзона в пределах геномных координат chr16: 10902662-chr16:10923285, и при этом клетка дополнительно содержит экзогенную нуклеиновую кислоту, и при этом в клетке

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

[00132] Сконструированная клетка может представлять собой любой из типичных типов клеток, описанных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления сконструированная клетка представляет собой иммунную клетку. В некоторых вариантах осуществления сконструированная клетка представляет собой гемопоэтическую стволовую клетку (ГСК). В некоторых вариантах осуществления сконструированная

клетка представляет собой индуцированную плюрипотентную стволовую клетку (iPSC). В некоторых вариантах осуществления сконструированная клетка представляет собой моноцит, макрофаг, тучную клетку, дендритную клетку или гранулоцит. В некоторых вариантах осуществления сконструированная клетка представляет собой моноцит. В некоторых вариантах осуществления сконструированная клетка представляет собой макрофаг. В некоторых вариантах осуществления сконструированная клетка представляет собой тучную клетку. В некоторых вариантах осуществления сконструированная клетка представляет собой дендритную клетку.

[00133] В некоторых вариантах осуществления сконструированная клетка представляет собой гранулоцит. В некоторых вариантах осуществления сконструированная клетка представляет собой лимфоцит. В некоторых вариантах осуществления сконструированная клетка представляет собой Т-клетку. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения сконструированная клетка представляет собой Т-клетку CD4+. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения сконструированная клетка представляет собой Т-клетку CD8+. В некоторых вариантах осуществления сконструированная клетка представляет собой Т-клетку памяти. В некоторых вариантах осуществления сконструированная клетка представляет собой В-клетку. В некоторых вариантах осуществления сконструированная клетка представляет собой плазматическую В-клетку. В некоторых вариантах осуществления сконструированная клетка представляет собой В-клетку памяти.

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

[00135] В некоторых вариантах осуществления аллель HLA-C выбирают из любого из следующих аллелей HLA-C: HLA-C*07:02; HLA-C*07:01; HLA-C*05:01; HLA-C*04:01 HLA-C*03:04; HLA-C*06:02; HLA-C*08:02; HLA-C*03:03; HLA-C*06:02; HLA-C*16:01; HLA-C*12:03; HLA-C*07:01; HLA-C*04:01; HLA-C*15:02; HLA-C*07:01; HLA-C*03:04; HLA-C*12:03; HLA-C*02:02; HLA-C*04:01; HLA-C*05:01; HLA-C*12:02; HLA-C*14:02; HLA-C*06:02; HLA-C*04:01; HLA-C*03:03; HLA-C*07:04; HLA-C*07:01; HLA-C*04:01; HLA-C*04:01 и HLA-C*02:02.

[00136] В некоторых вариантах осуществления аллель HLA-B выбирают из любого из следующих аллелей HLA-B: HLA-B*07:02; HLA-B*08:01; HLA-B*44:02; HLA-B*35:01; HLA-B*40:01; HLA-B*57:01; HLA-B*14:02; HLA-B*15:01; HLA-B*13:02; HLA-B*44:03; HLA-B*38:01; HLA-B*18:01; HLA-B*44:03; HLA-B*51:01; HLA-B*49:01; HLA-B*15:01; HLA-B*18:01; HLA-B*27:05; HLA-B*35:03; HLA-B*18:01; HLA-B*52:01; HLA-B*51:01;

HLA-B*37:01; HLA-B*53:01; HLA-B*55:01; HLA-B*44:02; HLA-B*44:03; HLA-B*35:02; HLA-B*15:01 и HLA-B*40:02; и аллель HLA-C выбран из любого из следующих аллелей HLA-C: HLA-C*07:02; HLA-C*07:01; HLA-C*05:01; HLA-C*04:01 HLA-C*03:04; HLA-C*06:02; HLA-C*08:02; HLA-C*03:03; HLA-C*06:02; HLA-C*16:01; HLA-C*12:03; HLA-C*07:01; HLA-C*04:01; HLA-C*15:02; HLA-C*07:01; HLA-C*03:04; HLA-C*12:03; HLA-C*02:02; HLA-C*04:01; HLA-C*05:01; HLA-C*12:02; HLA-C*14:02; HLA-C*06:02; HLA-C*04:01; HLA-C*03:03; HLA-C*07:04; HLA-C*07:01; HLA-C*04:01; HLA-C*04:01 и HLA-C*02:02.

[00137] В некоторых вариантах осуществления сконструированная клетка является гомозиготной по HLA-B и гомозиготной по HLA-C, и аллели HLA-B и HLA-C выбраны из любого из следующих аллелей HLA-B и HLA-C: HLA-B*07:02 и HLA-C*07:02; HLA-B*08:01 и HLA-C*07:01; HLA-B*44:02 и HLA-C*05:01; HLA-B*35:01 и HLA-C*04:01; HLA-B*40:01 и HLA-C*03:04; HLA-B*57:01 и HLA-C*06:02; HLA-B*14:02 и HLA-C*08:02; HLA-B*15:01 и HLA-C*03:03; HLA-B*13:02 и HLA-C*06:02; HLA-B*44:03 и HLA-C*16:01; HLA-B*38:01 и HLA-C*12:03; HLA-B*18:01 и HLA-C*07:01; HLA-B*44:03 и HLA-C*04:01; HLA-B*51:01 и HLA-C*15:02; HLA-B*49:01 и HLA-C*07:01; HLA-B*15:01 и HLA-C*03:04; HLA-B*18:01 и HLA-C*12:03; HLA-B*27:05 и HLA-C*02:02; HLA-B*35:03 и HLA-C*04:01; HLA-B*18:01 и HLA-C*05:01; HLA-B*52:01 и HLA-C*12:02; HLA-B*51:01 и HLA-C*14:02; HLA-B*37:01 и HLA-C*06:02; HLA-B*53:01 и HLA-C*04:01; HLA-B*55:01 и HLA-C*03:03; HLA-B*44:02 и HLA-C*07:04; HLA-B*44:03 и HLA-C*07:01; HLA-B*35:02 и HLA-C*04:01; HLA-B*15:01 и HLA-C*04:01; и HLA-B*40:02 и HLA-C*02:02. В некоторых вариантах осуществления клетка является гомозиготной по HLA-B и гомозиготной по HLA-C, а аллели HLA-B и HLA-C представляют собой HLA-B*07:02 и HLA-C*07:02. В некоторых вариантах осуществления клетка является гомозиготной по HLA-B и гомозиготной по HLA-C, а аллели HLA-B и HLA-C представляют собой HLA-B*08:01 и HLA-C*07:01. В некоторых вариантах осуществления клетка является гомозиготной по HLA-B и гомозиготной по HLA-C, а аллели HLA-B и HLA-C представляют собой HLA-B*44:02 и HLA-C*05:01. В некоторых вариантах осуществления клетка является гомозиготной по HLA-B и гомозиготной по HLA-C, а аллели HLA-B и HLA-C представляют собой HLA-B*35:01 и HLA-C*04:01.

[00138] В некоторых вариантах осуществления предложена фармацевтическая композиция, содержащая любую из описанных в данном документе сконструированных клеток. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит популяцию любой из описанных в данном документе сконструированных клеток. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит популяцию сконструированных клеток, которая по меньшей мере на 65% отрицательна по данным проточной цитометрии. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит популяцию сконструированных клеток, которая по меньшей мере на 70% отрицательна по данным проточной цитометрии. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит популяцию сконструированных

клеток, которая по меньшей мере на 80% отрицательна по данным проточной цитометрии. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит популяцию сконструированных клеток, которая по меньшей мере на 90% отрицательна по данным проточной цитометрии. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит популяцию сконструированных клеток, которая по меньшей мере на 91% отрицательна по данным проточной цитометрии. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит популяцию сконструированных клеток, которая по меньшей мере на 92% отрицательна по данным проточной цитометрии. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит популяцию сконструированных клеток, которая по меньшей мере на 93% отрицательна по данным проточной цитометрии. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит популяцию сконструированных клеток, которая по меньшей мере на 94% отрицательна по данным проточной цитометрии. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит популяцию сконструированных клеток, которая по меньшей мере на 95% является отрицательной по эндогенному белку TCR по данным проточной цитометрии. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит популяцию сконструированных клеток, которая по меньшей мере на 97% является отрицательной по эндогенному белку TCR по данным проточной цитометрии. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит популяцию сконструированных клеток, которая по меньшей мере на 98% является отрицательной по эндогенному белку TCR по данным проточной цитометрии. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит популяцию сконструированных клеток, которая по меньшей мере на 99% является отрицательной по эндогенному белку TCR по данным проточной цитометрии.

[00139] В некоторых вариантах осуществления предложены способы введения сконструированных клеток или фармацевтических композиций, описанных в данном документе, нуждающемуся в этом субъекту. В некоторых вариантах осуществления предложены способы введения сконструированных клеток или фармацевтических композиций, описанных в данном документе, субъекту в качестве терапии на основе АПК. В некоторых вариантах осуществления предложены способы введения сконструированных клеток или фармацевтических композиций, описанных в данном документе, субъекту для лечения рака. В некоторых вариантах осуществления предложены способы введения сконструированных клеток или фармацевтических композиций, описанных в данном документе, субъекту для лечения аутоиммунного заболевания. В некоторых вариантах осуществления предложены способы введения сконструированных клеток или фармацевтических композиций, описанных в данном документе, субъекту для лечения инфекционного заболевания.

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

[00140] В данном изобретении предложены способы и композиции для снижения

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

[00141] В некоторых вариантах осуществления способы включают снижение или устранение поверхностной экспрессии белка MHC класса II на поверхности клетки, включающее приведение клетки в контакт с композицией, содержащей направляющую РНК CIITA, содержащую i) направляющую последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1-117; ii) по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 последовательных нуклеотидов последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 1-117; ii) направляющей последовательности, на по меньшей мере 95%, 90% или 85% идентичной последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 1-117; iv) последовательности, которая содержит 10 последовательных нуклеотидов ±10 нуклеотидов геномной координаты, указанной в **Таблице 2**; v) по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 последовательных нуклеотидов последовательности из (iv); или vi) направляющей последовательности, которая на по меньшей мере 95%, 90% или 85% идентична последовательности, выбранной из (v). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения указанные способы дополнительно включают приведение клетки в контакт с РНК-направляемым ДНК-связывающим агентом, или нуклеиновой кислотой, кодирующей РНК-направляемый ДНК-связывающий агент. В некоторых вариантах осуществления РНК-направляемый ДНК-связывающий агент представляет собой Cas9. В некоторых вариантах осуществления РНК-направляемый ДНК-связывающий агент представляет собой Cas9 S. pyogenes. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК представляет собой РНК-направляемый Cas9 S. pyogenes. В некоторых вариантах осуществления РНК-направляемый ДНК-связывающий агент дополнительно содержит домен дезаминазы. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, содержит дезаминазу APOBEC3A (A3A) и никазу, управляемую РНК. В некоторых вариантах осуществления экспрессия белка MHC класса II на поверхности клетки (*m.e.* сконструированной клетки) тем самым снижается.

[00142] В некоторых вариантах осуществления способы включают создание сконструированной клетки, в которой снижена или устранена поверхностная экспрессия

белка MHC класса II по сравнению с немодифицированной клеткой, включающие приведение клетки в контакт с композицией, содержащей CIITA-направляющую РНК, содержащую i) направляющую последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1-117; ii) по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 последовательных нуклеотидов последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 1-117; ii) направляющей последовательности, на по меньшей мере 95%, 90% или 85% идентичной последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 1-117; iv) последовательности, которая содержит 10 последовательных нуклеотидов ±10 нуклеотидов геномной координаты, указанной в **Таблице 2**; v) по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 последовательных нуклеотидов последовательности из (iv); или vi) направляющей последовательности, которая на по меньшей мере 95%, 90% или 85% идентична последовательности, выбранной из (v). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения указанные способы дополнительно включают приведение клетки в контакт с РНК-направляемым ДНК-связывающим агентом, или нуклеиновой кислотой, кодирующей РНК-направляемый ДНК-связывающий агент. В некоторых вариантах осуществления РНК-направляемый ДНК-связывающий агент представляет собой Cas9. В некоторых вариантах осуществления РНК-направляемый ДНК-связывающий агент представляет собой Cas9 S. pyogenes. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК представляет собой РНК-направляемый Cas9 S. pyogenes. В некоторых вариантах осуществления РНК-направляемый ДНК-связывающий агент дополнительно содержит область дезаминазы. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, содержит дезаминазу APOBEC3A (A3A) и никазу, управляемую РНК. В некоторых вариантах осуществления экспрессия белка MHC класса II на поверхности клетки (*m.e.* сконструированной клетки) тем самым снижается.

[00143] В некоторых вариантах осуществления способы включают генетическую модификацию клетки для снижения или устранения поверхностной экспрессии белка MHC класса II, включающие приведение клетки в контакт с композицией, содержащей CIITA-направляющую РНК, содержащую i) направляющую последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1-117; ii) по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 последовательных нуклеотидов последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 1-117; ii) направляющей последовательности, на по меньшей мере 95%, 90% или 85% идентичной последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 1-117; iv) последовательности, которая содержит 10 последовательных нуклеотидов ±10 нуклеотидов геномной координаты, указанной в **Таблице 2**; v) по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 последовательных нуклеотидов последовательности из (iv); или vi) направляющей последовательности, которая на по меньшей мере 95%, 90% или 85% идентична последовательности, выбранной из (v). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения указанные способы дополнительно включают приведение клетки в контакт с РНК-направляемым ДНК-связывающим агентом, или нуклеиновой кислотой, кодирующей РНК-направляемый ДНК-связывающий агент. В некоторых вариантах осуществления РНК-направляемый ДНК-связывающий агент представляет собой Cas9. В некоторых

вариантах осуществления РНК-направляемый ДНК-связывающий агент представляет собой Cas9 S. pyogenes. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК представляет собой РНК-направляемый Cas9 S. pyogenes. В некоторых вариантах осуществления РНК-направляемый ДНК-связывающий агент дополнительно содержит область дезаминазы. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, содержит дезаминазу APOBEC3A (A3A) и никазу, управляемую РНК. В некоторых вариантах осуществления экспрессия белка MHC класса II на поверхности клетки (*m.e.* сконструированной клетки) тем самым снижается.

[00144] В некоторых вариантах осуществления способы снижения экспрессии белка MHC класса II на поверхности клетки включают приведение клетки в контакт с любой одной или несколькими CIITA-направленными РНК, описанными в данном документе. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит направляющую последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1-117.

[00145] В некоторых вариантах осуществления предложены композиции, содержащие CIITA-направляющую РНК, содержащую i) направляющую последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1-117; ii) по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 последовательных нуклеотидов последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 1-117; ii) направляющей последовательности, на по меньшей мере 95%, 90% или 85% идентичной последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 1-117; iv) последовательности, которая содержит 10 последовательных нуклеотидов ±10 нуклеотидов геномной координаты, указанной в **Таблице 2**; v) по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 последовательных нуклеотидов последовательности из (iv); или vi) направляющей последовательности, которая на по меньшей мере 95%, 90% или 85% идентична последовательности, выбранной из (v). В некоторых вариантах осуществления композиция дополнительно содержит РНК-направляемый ДНК-связывающий агент или нуклеиновую кислоту, кодирующую РНК-направляемый ДНК-связывающий агент. В некоторых вариантах осуществления композиция содержит РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, который представляет собой Cas9. В некоторых вариантах осуществления РНК-направляемый ДНК-связывающий агент представляет собой Cas9 S. pyogenes. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК представляет собой РНК-направляемый Cas9 S. pyogenes. В некоторых вариантах осуществления РНК-направляемый ДНК-связывающий агент дополнительно содержит область дезаминазы. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, содержит дезаминазу APOBEC3A (A3A) и никазу, управляемую РНК.

[00146] В любом из вышеуказанных вариантов осуществления направляющая последовательность выбрана из SEQ ID SEQ ID NO: 32, 64, 67, 68, 74, 76, 84, 86, 90, 91 и 115; ii) по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 последовательных нуклеотидов последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 32, 64, 67, 68, 74, 76, 84, 86, 90, 91 и 115; ii) направляющей последовательности, на по меньшей мере 95%, 90% или 85%

идентичной последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 32, 64, 67, 68, 74, 76, 84, 86, 90, 91 и 115.

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

[00148] В некоторых вариантах осуществления предложена сконструированная клетка, полученная способами, описанными в данном документе. В некоторых вариантах осуществления сконструированная клетка, полученная способами и композициями, описанными в данном документе, представляет собой аллогенную клетку. В некоторых вариантах осуществления способы позволяют получить композицию, содержащую сконструированную клетку со сниженной экспрессией MHC класса II. В некоторых вариантах осуществления способы позволяют получить композицию, содержащую сконструированную клетку со сниженной экспрессией белка CIITA. В некоторых вариантах осуществления способы позволяют получить композицию, содержащую сконструированную клетку со сниженными уровнями CIITA в ядре клетки. В некоторых вариантах осуществления способы позволяют получить композицию, содержащую сконструированную клетку, которая экспрессирует усеченную форму белка CIITA. В некоторых вариантах осуществления способы позволяют получить композицию, содержащую сконструированную клетку, которая не продуцирует обнаруживаемый белок CIITA. В некоторых вариантах осуществления сконструированная клетка имеет сниженную экспрессию MHC класса II, сниженный уровень белка CIITA и/или сниженный уровень CIITA в ядре клетки по сравнению с немодифицированной клеткой. В некоторых вариантах осуществления сконструированная клетка, полученная способами, описанными в данном документе, вызывает сниженную ответ CD4+ T-клеток по сравнению с немодифицированной клеткой, как было измерено в анализе клеточной культуры in vitro, содержащем CD4+ T-клетки.

[00149] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения композиции, описанные в настоящем документе, дополнительно содержат фармацевтически приемлемый носитель. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения композиции, описанные в настоящем документе, дополнительно содержат фармацевтически приемлемый носитель. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предлагаются композиции, содержащие описанные в настоящем документе клетки.

1. CIITA-направленные РНК

[00150] Способы и композиции, предложенные в данном документе, описывают CIITA-направленные РНК, применимые для снижения экспрессии белка MHC класса II на

поверхности клетки. В некоторых вариантах осуществления такие направляющие РНК направляют РНК-направляемый ДНК-связывающий агент к геномной целевой последовательности CIITA и могут упоминаться в данном документе как «CIITA-направленные РНК». В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК направляет РНК-направляемый ДНК-связывающий агент к геномной целевой последовательности CIITA человека. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит направляющую последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1-117.

[00151] В некоторых вариантах осуществления предложена композиция, содержащая CIITA-направленную РНК, описанную в данном документе, и РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, или нуклеиновую кислоту, кодирующую РНК-направляемый ДНК-связывающий агент.

[00152] В некоторых вариантах осуществления предложена CIITA-одиночная-направляющая РНК (онРНК), содержащая направляющую последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1-117. В некоторых вариантах осуществления предложена композиция, содержащая CIITA-одиночную-направляющую РНК (онРНК), содержащую направляющую последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1-117. В некоторых вариантах осуществления предложена композиция, содержащая CIITA-онРНК, описанную в данном документе, и РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, или нуклеиновую кислоту, кодирующую РНК-направляемый ДНК-связывающий агент.

[00153] В некоторых вариантах осуществления предложена CIITA-двойная-направляющая РНК (днРНК), содержащая направляющую последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1-117. В некоторых вариантах осуществления предложена композиция, содержащая CIITA-двойную-направляющую РНК (днРНК), содержащую направляющую последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1-117. В некоторых вариантах осуществления предложена композиция, содержащая CIITA-днРНК, описанную в данном документе, и РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, или нуклеиновую кислоту, кодирующую РНК-направляемый ДНК-связывающий агент.

[00154] Примеры CIITA-направляющих последовательностей показаны ниже в **Таблице 2** (SEQ ID NO: 1-117 с соответствующими последовательностями направляющей РНК SEQ ID NO: 218-334 и 335-426).

[00155] **Таблица 2. Иллюстративные CIITA-направленные последовательности.**

ID направляющей	SEQ ID NO к направляющей последовательности	Тип	Направляющая последовательность	Иллюстративная полная последовательность направляющей РНК (SEQ ID NO: 218-334)	Иллюстративная модифицированная последовательность направляющей РНК (SEQ ID NO: 335-426)	Геномные координаты
CR002961	1	crРНК	CAGCUCACAGUGUGCCAC CA	CAGCUCACAGUGUGCCACCAGUUUUAGAGCUAUGCUGUUUUG		chr16:10895282-10895302
CR002966	2	crРНК	UUCUAGGGGCCCCAACUCCA	UUCUAGGGGCCCCAACUCCAGUUUUAGAGCUAUGCUGUUUUG		chr16:10895302-10895322
CR002967	3	crРНК	AUGGAGUUGGGGCCCCUAGA	AUGGAGUUGGGGCCCCUAGAGUUUUAGAGCUAUGCUGUUUUG		chr16:10895301-10895321
CR002971	4	crРНК	CUCCAGGUAGCCACCUUCUA	CUCCAGGUAGCCACCUUCUAGUUUUAGAGCUAUGCUGUUUUG		chr16:10895317-10895337
CR002991	5	crРНК	AGGCUG	AGGCUGUU		chr16:10895

			UUGUGUGACAUGGA	GUGUGACAUGGAGUUUUAGAGCUAUGCUGUUUUG		706-10895726
CR002995	6	crPHK	GAUAUUGGCAUAAGCCUCCC	GAUAUUGGCAUAAGCCUCCCGUUUUAGAGCUAUGCUGUUUUG		chr16:10895743-10895763
CR003009	7	crPHK	UGAAGUGAUCGGUGAGAGUA	UGAAGUGAUCGGUGAGAGUAGUUUUAGAGCUAUGCUGUUUUG		chr16:10898940-10898960
CR003011	8	crPHK	UGGAGAUGCCAGCAGAAGUU	UGGAGAUGCCAGCAGAAGUUGUUUUAGAGCUAUGCUGUUUUG		chr16:10898960-10898980
CR003014	9	crPHK	GGUCUGCCGGAAGCUCCUCU	GGUCUGCCGGAAGCUCCUCUGUUUUAGAGCUAUGCUGUUUUG		chr16:10901520-10901540
CR007938	10	crPHK	UUUUACCUUGGGGCUCUGAC	UUUUACCUUGGGGCUCUGACGUUUUAGAGCUAUGCUGUUUUG		chr16:10877368-10877388

CR007955	11	crPHK	UCCAAGCCCCCUAACAUACU	UCCAAGCCCCCUAACAUACUGUUUUAGAGCUAUGCUGUUUUG		chr16:10902183-10902203
CR007982	12	crPHK	CCCCCGGACGGUUCAAGCAA	CCCCCGGACGGUUCAAGCAAGUUUUAGAGCUAUGCUGUUUUG		chr16:10906853-10906873
CR007994	13	crPHK	GGACGGUUCAAGCAAUGGCA	GGACGGUUCAAGCAAUGGCAGUUUUAGAGCUAUGCUGUUUUG		chr16:10906848-10906868
CR007997	14	crPHK	CCCGGAUGGCAUCCUAGUGG	CCCGGAUGGCAUCCUAGUGGGUUUUAGAGCUAUGCUGUUUUG		chr16:10906556-10906576
CR009188	15	crPHK	CAGUGGCUGAUGGAGCGAAG	CAGUGGCUGAUGGAGCGAAGGUUUUAGAGCUAUGCUGUUUUG		chr16:10903824-10903844
CR009202	16	crPHK	GAGAAGACAAAGUCGUACUG	GAGAAGACAAAGUCGUACUGGUUUUAGAGCUAUGCUGUUU		chr16:10906821-10906841

				UG		
CR009206	17	crPHK	CGUCUAGGAUGAGCAGAACG	CGUCUAGGAUGAGCAGAACGGUUUUAGAGCUAUGCUGUUUUG		chr16:10906970-10906990
CR009208	18	crPHK	GACGGUUCAAGCAAUGGCAG	GACGGUUCAAGCAAUGGCAGGUUUUAGAGCUAUGCUGUUUUG		chr16:10906847-10906867
CR009211	19	crPHK	UGAGAAGAAGUGGCCGGUCC	UGAGAAGAAGUGGCCGGUCCGUUUUAGAGCUAUGCUGUUUUG		chr16:10907288-10907308
CR009217	20	crPHK	UGGUCAGGGCAAGAGCUAUU	UGGUCAGGGCAAGAGCUAUUGUUUUAGAGCUAUGCUGUUUUG		chr16:10906757-10906777
CR009229	21	crPHK	GUUCCUCGGAAGACACAGCU	GUUCCUCGGAAGACACAGCUGUUUUAGAGCUAUGCUGUUUUG		chr16:10910195-10910215
CR009230	22	crPHK	UUCCUCGGAAGACACAGCUG	UUCCUCGGAAGACACAGCUGGUUUUAGAGCUA		chr16:10910196-10910216

				UGCUGUUU UG		
CR009234	23	crРНК	GCUGAG UGAGAA CAAGAU CG	GCUGAGUG AGAACAAG AUCGGUUU UAGAGCUA UGCUGUUU UG		chr16:10916 375-10916395
CR009235	24	crРНК	GAGAAC AAGAUC GGGGAC GA	GAGAACAA GAUCGGGG ACGAGUUU UAGAGCUA UGCUGUUU UG		chr16:10916 382-10916402
CR009238	25	crРНК	CCACAU GAGGAC ACCUCC GA	CCACAUGA GGACACCU CCGAGUUU UAGAGCUA UGCUGUUU UG		chr16:10922 460-10922480
G013674	26	онРНК	UUCUAG GGGCCC CAACUC CA	UUCUAGGG GCCCCAACU CCAGUUUU AGAGCUAG AAAUAGCA AGUUAAAA UAAGGCUA GUCCGUUA UCAACUUG AAAAAGUG GCACCGAG UCGGUGCU UUU	mU*mU*mC *UAGGGG CCCCAAC UCCAGUU UUAGAmG mCmUmAm GmAmAmA mUmAmGm CAAGUUA AAAUAAG GCUAGUC CGUUAUC AmAmCmU mUmGmAm AmAmAmA	chr16:10895 302-10895322

					mGmUmGm GmCmAmC mCmGmAm GmUmCmG mGmUmGm CmU*mU*m U*mU	
G013675	27	онРНК	CCCCCG GACGGU UCAAGC AA	CCCCCGGAC GGUUCAAG CAAGUUUU AGAGCUAG AAAUAGCA AGUUAAAA UAAGGCUA GUCCGUUA UCAACUUG AAAAAGUG GCACCGAG UCGGUGCU UUU	mC*mC*mC *CCGGACG GUUCAAG CAAGUUU UAGAmGm CmUmAmG mAmAmAm UmAmGmC AAGUUAA AAUAAGG CUAGUCC GUUAUCA mAmCmUm UmGmAmA mAmAmAm GmUmGmG mCmAmCm CmGmAmG mUmCmGm GmUmGmC mU*mU*m U*mU	chr16:10906 853- 10906873
G013676	28	онРНК	UGGUCA GGGCAA GAGCUA UU	UGGUCAGG GCAAGAGC UAUUGUUU UAGAGCUA GAAAUAGC AAGUUAAA	mU*mG*m G*UCAGG GCAAGAG CUAUUGU UUUAGAm GmCmUmA	chr16:10906 757- 10906777

				AUAAGGCU AGUCCGUU AUCAACUU GAAAAAGU GGCACCGA GUCGGUGC UUUU	mGmAmAm AmUmAmG mCAAGUU AAAAUAA GGCUAGU CCGUUAU CAmAmCm UmUmGmA mAmAmAm AmGmUmG mGmCmAm CmCmGmA mGmUmCm GmGmUmG mCmU*mU* mU*mU	
G015535	29	онРНК	UUCUAG GGGCCC CAACUC CA	UUCUAGGG GCCCCAACU CCAGUUUU AGAGCUAG AAAUAGCA AGUUAAAA UAAGGCUA GUCCGUUA UCAACUUG AAAAAGUG GCACCGAG UCGGUGCU UUU	UUCUAGG GGCCCCA ACUCCAG UUUUAGA GCUAGAA AUAGCAA GUUAAAA UAAGGCU AGUCCGU UAUCAAC UUGAAAA AGUGGCA CCGAGUC GGUGCUU UU	chr16:10895302-10895322
G016030	30	онРНК	UCAACU GCGACC AGUUCA GC	UCAACUGC GACCAGUU CAGCGUUU UAGAGCUA	mU*mC*mA *ACUGCGA CCAGUUC AGCGUUU	chr16:10895686-10895706

				GAAAUAGC AAGUUAAA AUAAGGCU AGUCCGUU AUCAACUU GAAAAAGU GGCACCGA GUCGGUGC UUUU	UAGAmGm CmUmAmG mAmAmAm UmAmGmC AAGUUAA AAUAAGG CUAGUCC GUUAUCA mAmCmUm UmGmAmA mAmAmAm GmUmGmG mCmAmCm CmGmAmG mUmCmGm GmUmGmC mU*mU*m U*mU	
G016031	31	онРНК	AGCGCA GGCAGU GGCAGG CA	AGCGCAGG CAGUGGCA GGCAGUUU UAGAGCUA GAAAUAGC AAGUUAAA AUAAGGCU AGUCCGUU AUCAACUU GAAAAAGU GGCACCGA GUCGGUGC UUUU	mA*mG*mC *GCAGGCA GUGGCAG GCAGUUU UAGAmGm CmUmAmG mAmAmAm UmAmGmC AAGUUAA AAUAAGG CUAGUCC GUUAUCA mAmCmUm UmGmAmA mAmAmAm GmUmGmG mCmAmCm	chr16:10902 105- 10902125

					CmGmAmG mUmCmGm GmUmGmC mU*mU*m U*mU	
G016032	32	онРНК	ACCUGC AACAAC AGGAUU CA	ACCUGCAA CAACAGGA UUCAGUUU UAGAGCUA GAAAUAGC AAGUUAAA AUAAGGCU AGUCCGUU AUCAACUU GAAAAAGU GGCACCGA GUCGGUGC UUUU	mA*mC*mC *UGCAACA ACAGGAU UCAGUUU UAGAmGm CmUmAmG mAmAmAm UmAmGmC AAGUUAA AAUAAGG CUAGUCC GUUAUCA mAmCmUm UmGmAmA mAmAmAm GmUmGmG mCmAmCm CmGmAmG mUmCmGm GmUmGmC mU*mU*m U*mU	chr16:10923 265- 10923285
G016033	33	онРНК	CCAGGA ACACCU GCAACA AC	CCAGGAAC ACCUGCAA CAACGUUU UAGAGCUA GAAAUAGC AAGUUAAA AUAAGGCU AGUCCGUU	mC*mC*mA *GGAACAC CUGCAAC AACGUUU UAGAmGm CmUmAmG mAmAmAm UmAmGmC	chr16:10923 257- 10923277

				AUCAACUU GAAAAAGU GGCACCGA GUCGGUGC UUUU	AAGUUAA AAUAAGG CUAGUCC GUUAUCA mAmCmUm UmGmAmA mAmAmAm GmUmGmG mCmAmCm CmGmAmG mUmCmGm GmUmGmC mU*mU*m U*mU	
G016034	34	онРНК	CAGCAG CAAGAG CCUGGA GC	CAGCAGCA AGAGCCUG GAGCGUUU UAGAGCUA GAAAUAGC AAGUUAAA AUAAGGCU AGUCCGUU AUCAACUU GAAAAAGU GGCACCGA GUCGGUGC UUUU	mC*mA*mG *CAGCAAG AGCCUGG AGCGUUU UAGAmGm CmUmAmG mAmAmAm UmAmGmC AAGUUAA AAUAAGG CUAGUCC GUUAUCA mAmCmUm UmGmAmA mAmAmAm GmUmGmG mCmAmCm CmGmAmG mUmCmGm GmUmGmC mU*mU*m	chr16:10906610-10906630

					U*mU	
G016035	35	онРНК	GCAGCAGCAAGAGCCUGG AG	GCAGCAGCAAGAGCCUGGAGGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU	mG*mC*mA*GCAGCAAGAGCCUGGAGGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmGmGmCmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU*mU	chr16:10906609-10906629
G016036	36	онРНК	CAAUCUCUUCUUCCAGCC	CAAUCUCUUCUUCCAGCCGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGC	mC*mA*mA*UCUCUUCUUCUCCAGCCGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCA	chr16:10895396-10895416

				UUUU	mAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	
G016037	37	онРНК	AGCAGCUCGCUGCCAGCCUU	AGCAGCUCGCUGCCAGCCUUGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU	mA*mG*mC*AGCUCGCUGCCAGCCUUGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	chr16:10922441-10922461
G016038	38	онРНК	AGCUCGCUGCCAGCCUUC	AGCUCGCUGCCAGCCUUCGGGUUU	mA*mG*mC*UCGCUGCCAGCCUU	chr16:10922444-10922464

			GG	UAGAGCUA GAAAUAGC AAGUUAAA AUAAGGCU AGUCCGUU AUCAACUU GAAAAAGU GGCACCGA GUCGGUGC UUUU	CGGGUUU UAGAmGm CmUmAmG mAmAmAm UmAmGmC AAGUUAA AAUAAGG CUAGUCC GUUAUCA mAmCmUm UmGmAmA mAmAmAm GmUmGmG mCmAmCm CmGmAmG mUmCmGm GmUmGmC mU*mU*m U*mU	
G016039	39	онРНК	CUCUGG ACCAGG CGGCCC CG	CUCUGGAC CAGGCGGC CCCGGUUU UAGAGCUA GAAAUAGC AAGUUAAA AUAAGGCU AGUCCGUU AUCAACUU GAAAAAGU GGCACCGA GUCGGUGC UUUU	mC*mU*mC *UGGACCA GGCGGCC CCGGUUU UAGAmGm CmUmAmG mAmAmAm UmAmGmC AAGUUAA AAUAAGG CUAGUCC GUUAUCA mAmCmUm UmGmAmA mAmAmAm GmUmGmG	chr16:10907139-10907159

					mCmAmCm CmGmAmG mUmCmGm GmUmGmC mU*mU*m U*mU	
G016040	40	онРНК	GCAGCC CUCGAC AGCCCC CC	GCAGCCCUC GACAGCCCC CCGUUUUA GAGCUAGA AAUAGCAA GUUAAAAU AAGGCUAG UCCGUUAU CAACUUGA AAAAGUGG CACCGAGU CGGUGCUU UU	mG*mC*mA *GCCCUCG ACAGCCC CCCGUUU UAGAmGm CmUmAmG mAmAmAm UmAmGmC AAGUUAA AAUAAGG CUAGUCC GUUAUCA mAmCmUm UmGmAmA mAmAmAm GmUmGmG mCmAmCm CmGmAmG mUmCmGm GmUmGmC mU*mU*m U*mU	chr16:10907 433- 10907453
G016041	41	онРНК	CAGCCC UCGACA GCCCCCC C	CAGCCCUCG ACAGCCCCC CCGUUUUA GAGCUAGA AAUAGCAA GUUAAAAU AAGGCUAG	mC*mA*mG *CCCUCGA CAGCCCCC CCGUUUU AGAmGmC mUmAmGm AmAmAmU	chr16:10907 434- 10907454

				UCCGUUAU CAACUUGA AAAAGUGG CACCGAGU CGGUGCUU UU	mAmGmCA AGUUAAA AUAAGGC UAGUCCG UUAUCAm AmCmUmU mGmAmAm AmAmAmG mUmGmGm CmAmCmC mGmAmGm UmCmGmG mUmGmCm U*mU*mU* mU	
G016042	42	онРНК	AGCCAA GUACCC CCUCCC AG	AGCCAAGU ACCCCCUCC CAGGUUUU AGAGCUAG AAAUAGCA AGUUAAAA UAAGGCUA GUCCGUUA UCAACUUG AAAAAGUG GCACCGAG UCGGUGCU UUU	mA*mG*mC *CAAGUAC CCCCUCCC AGGUUUU AGAmGmC mUmAmGm AmAmAmU mAmGmCA AGUUAAA AUAAGGC UAGUCCG UUAUCAm AmCmUmU mGmAmAm AmAmAmG mUmGmGm CmAmCmC mGmAmGm UmCmGmG mUmGmCm	chr16:10903 747- 10903767

					U*mU*mU*mU	
G016043	43	онРНК	CAGCCAACAGCACCUCAGCC	CAGCCAACAGCACCUCAGCCGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU	mC*mA*mG*CCAACAGCACCUCAGCCGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmGmGmCmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	chr16:10906682-10906702
G016044	44	онРНК	UGCCGCGCCCGCAGUGUCC	UGCCGCGCCCGCAGUGUCCCGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAG	mU*mG*mC*CGCGCCCGCAGUGUCCCGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCC	chr16:10907886-10907906

				UCGGUGCUUUU	GUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	
G016045	45	онРНК	CGACAGCCCCCCCCGGGGCCC	CGACAGCCCCCCCGGGGCCCGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU	mC*mG*mA*CAGCCCCCCCCGGGGCCCGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	chr16:10907441-10907461
G016046	46	онРНК	GGCAGCGAGCUG	GGCAGCGAGCUGCUGG	mG*mG*mC*AGCGAGC	chr16:10922435-

			CUGGGCCC	GCCCGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU	UGCUGGGCCCGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmGmGmCmCmAmCmCmGmAmGmUmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	10922455
G016047	47	онРНК	GCCAGCUCUGCCAGGGCCC	GCCAGCUCUGCCAGGGCCCCGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU	mG*mC*mC*AGCUCUGCCAGGGCCCCGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAm	chr16:10907454-10907474

					GmUmGmG mCmAmCm CmGmAmG mUmCmGm GmUmGmC mU*mU*m U*mU	
G016048	48	онРНК	AGCGAG CGAAGG CAGGGC CU	AGCGAGCG AAGGCAGG GCCUGUUU UAGAGCUA GAAAUAGC AAGUUAAA AUAAGGCU AGUCCGUU AUCAACUU GAAAAAGU GGCACCGA GUCGGUGC UUUU	mA*mG*mC *GAGCGA AGGCAGG GCCUGUU UUAGAmG mCmUmAm GmAmAmA mUmAmGm CAAGUUA AAAUAAG GCUAGUC CGUUAUC AmAmCmU mUmGmAm AmAmAmA mGmUmGm GmCmAmC mCmGmAm GmUmCmG mGmUmGm CmU*mU*m U*mU	chr16:10918 486- 10918506
G016049	49	онРНК	AAGGCU GGCAGC GAGCUG CU	AAGGCUGG CAGCGAGC UGCUGUUU UAGAGCUA GAAAUAGC AAGUUAAA	mA*mA*m G*GCUGGC AGCGAGC UGCUGUU UUAGAmG mCmUmAm	chr16:10922 441- 10922461

				AUAAGGCU AGUCCGUU AUCAACUU GAAAAAGU GGCACCGA GUCGGUGC UUUU	GmAmAmA mUmAmGm CAAGUUA AAAUAAG GCUAGUC CGUUAUC AmAmCmU mUmGmAm AmAmAmA mGmUmGm GmCmAmC mCmGmAm GmUmCmG mGmUmGm CmU*mU*m U*mU	
G016050	50	онРНК	AGCCCU CGACAG CCCCCCC G	AGCCCUCG ACAGCCCCC CCGGUUUU AGAGCUAG AAAUAGCA AGUUAAAA UAAGGCUA GUCCGUUA UCAACUUG AAAAAGUG GCACCGAG UCGGUGCU UUU	mA*mG*mC *CCUCGAC AGCCCCCC CGGUUUU AGAmGmC mUmAmGm AmAmAmU mAmGmCA AGUUAAA AUAAGGC UAGUCCG UUAUCAm AmCmUmU mGmAmAm AmAmAmG mUmGmGm CmAmCmC mGmAmGm UmCmGmG	chr16:10907 435- 10907455

					mUmGmCmU*mU*mU*mU	
G016051	51	онРНК	GGAUGCAGCGAGCGAAGGCA	GGAUGCAGCGAGCGAAGGCAGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU	mG*mG*mA*UGCAGCGAGCGAAGGCAGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	chr16:10918492-10918512
G016052	52	онРНК	UCCACCGAGGCAGCCGCCGA	UCCACCGAGGCAGCCGCCGAGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGU	mU*mC*mC*ACCGAGGCAGCCGCCGAGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAUAAGG	chr16:10907820-10907840

				GGCACCGA GUCGGUGC UUUU	CUAGUCC GUUAUCA mAmCmUm UmGmAmA mAmAmAm GmUmGmG mCmAmCm CmGmAmG mUmCmGm GmUmGmC mU*mU*m U*mU	
G016053	53	онРНК	UCUCCA ACAAGC UUCCAA AA	UCUCCAAC AAGCUUCC AAAAGUUU UAGAGCUA GAAAUAGC AAGUUAAA AUAAGGCU AGUCCGUU AUCAACUU GAAAAAGU GGCACCGA GUCGGUGC UUUU	mU*mC*mU *CCAACAA GCUUCCA AAAGUUU UAGAmGm CmUmAmG mAmAmAm UmAmGmC AAGUUAA AAUAAGG CUAGUCC GUUAUCA mAmCmUm UmGmAmA mAmAmAm GmUmGmG mCmAmCm CmGmAmG mUmCmGm GmUmGmC mU*mU*m U*mU	chr16:10904 785-10904805
G016054	54	онРНК	AGCAGC	AGCAGCCCC	mA*mG*mC	chr16:10907

			CCCCGG AGGGAG CA	CGGAGGGA GCAGUUUU AGAGCUAG AAAUAGCA AGUUAAAA UAAGGCUA GUCCGUUA UCAACUUG AAAAAGUG GCACCGAG UCGGUGCU UUU	*AGCCCCC GGAGGGA GCAGUUU UAGAmGm CmUmAmG mAmAmAm UmAmGmC AAGUUAA AAUAAGG CUAGUCC GUUAUCA mAmCmUm UmGmAmA mAmAmAm GmUmGmG mCmAmCm CmGmAmG mUmCmGm GmUmGmC mU*mU*m U*mU	058-10907078
G016055	55	онРНК	GCCACA GCCCUA CUUUGU GC	GCCACAGCC CUACUUUG UGCGUUUU AGAGCUAG AAAUAGCA AGUUAAAA UAAGGCUA GUCCGUUA UCAACUUG AAAAAGUG GCACCGAG UCGGUGCU UUU	mG*mC*mC *ACAGCCC UACUUUG UGCGUUU UAGAmGm CmUmAmG mAmAmAm UmAmGmC AAGUUAA AAUAAGG CUAGUCC GUUAUCA mAmCmUm UmGmAmA	chr16:10907314-10907334

					mAmAmAm GmUmGmG mCmAmCm CmGmAmG mUmCmGm GmUmGmC mU*mU*m U*mU	
G016056	56	онРНК	CUGCGC CCACGA GGCCGA GG	CUGCGCCCA CGAGGCCG AGGGUUUU AGAGCUAG AAAUAGCA AGUUAAAA UAAGGCUA GUCCGUUA UCAACUUG AAAAAGUG GCACCGAG UCGGUGCU UUU	mC*mU*mG *CGCCCAC GAGGCCG AGGGUUU UAGAmGm CmUmAmG mAmAmAm UmAmGmC AAGUUAA AAUAAGG CUAGUCC GUUAUCA mAmCmUm UmGmAmA mAmAmAm GmUmGmG mCmAmCm CmGmAmG mUmCmGm GmUmGmC mU*mU*m U*mU	chr16:10907 924- 10907944
G016057	57	онРНК	CAGCCG CCGAUG GCCCGA GU	CAGCCGCCG AUGGCCCG AGUGUUUU AGAGCUAG AAAUAGCA	mC*mA*mG *CCGCCGA UGGCCCG AGUGUUU UAGAmGm	chr16:10907 810- 10907830

				AGUUAAAA UAAGGCUA GUCCGUUA UCAACUUG AAAAAGUG GCACCGAG UCGGUGCU UUU	CmUmAmG mAmAmAm UmAmGmC AAGUUAA AAUAAGG CUAGUCC GUUAUCA mAmCmUm UmGmAmA mAmAmAm GmUmGmG mCmAmCm CmGmAmG mUmCmGm GmUmGmC mU*mU*m U*mU	
G016058	58	онРНК	CGAGGC UCCCCA AUCCAG AG	CGAGGCUC CCCAAUCCA GAGGUUUU AGAGCUAG AAAUAGCA AGUUAAAA UAAGGCUA GUCCGUUA UCAACUUG AAAAAGUG GCACCGAG UCGGUGCU UUU	mC*mG*mA *GGCUCCC CAAUCCA GAGGUUU UAGAmGm CmUmAmG mAmAmAm UmAmGmC AAGUUAA AAUAAGG CUAGUCC GUUAUCA mAmCmUm UmGmAmA mAmAmAm GmUmGmG mCmAmCm CmGmAmG	chr16:10908 101-10908121

					mUmCmGm GmUmGmC mU*mU*m U*mU	
G016059	59	онРНК	CUCAAC GAGGAA CUGGAG AA	CUCAACGA GGAACUGG AGAAGUUU UAGAGCUA GAAAUAGC AAGUUAAA AUAAGGCU AGUCCGUU AUCAACUU GAAAAAGU GGCACCGA GUCGGUGC UUUU	mC*mU*mC *AACGAG GAACUGG AGAAGUU UUAGAmG mCmUmAm GmAmAmA mUmAmGm CAAGUUA AAAUAAG GCUAGUC CGUUAUC AmAmCmU mUmGmAm AmAmAmA mGmUmGm GmCmAmC mCmGmAm GmUmCmG mGmUmGm CmU*mU*m U*mU	chr16:10902 662-10902682
G016060	60	онРНК	CCACAG CCCUAC UUUGUG CC	CCACAGCCC UACUUUGU GCCGUUUU AGAGCUAG AAAUAGCA AGUUAAAA UAAGGCUA GUCCGUUA UCAACUUG	mC*mC*mA *CAGCCCU ACUUUGU GCCGUUU UAGAmGm CmUmAmG mAmAmAm UmAmGmC AAGUUAA	chr16:10907 315-10907335

				AAAAAGUG GCACCGAG UCGGUGCU UUU	AAUAAGG CUAGUCC GUUAUCA mAmCmUm UmGmAmA mAmAmAm GmUmGmG mCmAmCm CmGmAmG mUmCmGm GmUmGmC mU*mU*m U*mU	
G016061	61	онРНК	CAAGAG CCUGGA GCGGGA AC	CAAGAGCC UGGAGCGG GAACGUUU UAGAGCUA GAAAUAGC AAGUUAAA AUAAGGCU AGUCCGUU AUCAACUU GAAAAAGU GGCACCGA GUCGGUGC UUUU	mC*mA*mA *GAGCCUG GAGCGGG AACGUUU UAGAmGm CmUmAmG mAmAmAm UmAmGmC AAGUUAA AAUAAGG CUAGUCC GUUAUCA mAmCmUm UmGmAmA mAmAmAm GmUmGmG mCmAmCm CmGmAmG mUmCmGm GmUmGmC mU*mU*m U*mU	chr16:10906 616- 10906636

G016062	62	онРНК	GACUGCCAGUCACCACAG UG	GACUGCCAGUCACCACAGUGGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU	mG*mA*mC*UGCCAGUCACCACAGUGGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmGmGmCmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	chr16:10902047-10902067
G016063	63	онРНК	GCCCACGAGGCCGAGGAGGC	GCCCACGAGGCCGAGGAGGCAGGCGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU	mG*mC*mC*CACGAGGCCGAGGAGGCGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUm	chr16:10907928-10907948

					UmGmAmA mAmAmAm GmUmGmG mCmAmCm CmGmAmG mUmCmGm GmUmGmC mU*mU*m U*mU	
G016064	64	онРНК	AUCAGC CCAGCC AGAAAG CG	AUCAGCCC AGCCAGAA AGCGGUUU UAGAGCUA GAAAUAGC AAGUUAAA AUAAGGCU AGUCCGUU AUCAACUU GAAAAAGU GGCACCGA GUCGGUGC UUUU	mA*mU*mC *AGCCCAG CCAGAAA GCGGUUU UAGAmGm CmUmAmG mAmAmAm UmAmGmC AAGUUAA AAUAAGG CUAGUCC GUUAUCA mAmCmUm UmGmAmA mAmAmAm GmUmGmG mCmAmCm CmGmAmG mUmCmGm GmUmGmC mU*mU*m U*mU	chr16:10907 757- 10907777
G016065	65	онРНК	CAGAGA AGACAA AGUCGU AC	CAGAGAAG ACAAAGUC GUACGUUU UAGAGCUA	mC*mA*mG *AGAAGA CAAAGUC GUACGUU	chr16:10906 823- 10906843

				GAAAUAGC AAGUUAAA AUAAGGCU AGUCCGUU AUCAACUU GAAAAAGU GGCACCGA GUCGGUGC UUUU	UUAGAmG mCmUmAm GmAmAmA mUmAmGm CAAGUUA AAAUAAG GCUAGUC CGUUAUC AmAmCmU mUmGmAm AmAmAmA mGmUmGm GmCmAmC mCmGmAm GmUmCmG mGmUmGm CmU*mU*m U*mU	
G016066	66	онРНК	UGGGAG UCCCUG CAGCAG CA	UGGGAGUC CCUGCAGC AGCAGUUU UAGAGCUA GAAAUAGC AAGUUAAA AUAAGGCU AGUCCGUU AUCAACUU GAAAAAGU GGCACCGA GUCGGUGC UUUU	mU*mG*m G*GAGUCC CUGCAGC AGCAGUU UUAGAmG mCmUmAm GmAmAmA mUmAmGm CAAGUUA AAAUAAG GCUAGUC CGUUAUC AmAmCmU mUmGmAm AmAmAmA mGmUmGm GmCmAmC	chr16:10909 056- 10909076

					mCmGmAm GmUmCmG mGmUmGm CmU*mU*m U*mU	
G016067	67	онРНК	CAGCAG GCUGUU GUGUGA CA	CAGCAGGC UGUUGUGU GACAGUUU UAGAGCUA GAAAUAGC AAGUUAAA AUAAGGCU AGUCCGUU AUCAACUU GAAAAAGU GGCACCGA GUCGGUGC UUUU	mC*mA*mG *CAGGCUG UUGUGUG ACAGUUU UAGAmGm CmUmAmG mAmAmAm UmAmGmC AAGUUAA AAUAAGG CUAGUCC GUUAUCA mAmCmUm UmGmAmA mAmAmAm GmUmGmG mCmAmCm CmGmAmG mUmCmGm GmUmGmC mU*mU*m U*mU	chr16:10895 702-10895722
G016068	68	онРНК	CUGGUC AGGGCA AGAGCU AU	CUGGUCAG GGCAAGAG CUAUGUUU UAGAGCUA GAAAUAGC AAGUUAAA AUAAGGCU AGUCCGUU	mC*mU*mG *GUCAGG GCAAGAG CUAUGUU UUAGAmG mCmUmAm GmAmAmA mUmAmGm	chr16:10906 756-10906776

				AUCAACUU GAAAAAGU GGCACCGA GUCGGUGC UUUU	CAAGUUA AAAUAAG GCUAGUC CGUUAUC AmAmCmU mUmGmAm AmAmAmA mGmUmGm GmCmAmC mCmGmAm GmUmCmG mGmUmGm CmU*mU*m U*mU	
G016069	69	онРНК	CAGGUU CAGGCA UGCUGG GC	CAGGUUCA GGCAUGCU GGGCGUUU UAGAGCUA GAAAUAGC AAGUUAAA AUAAGGCU AGUCCGUU AUCAACUU GAAAAAGU GGCACCGA GUCGGUGC UUUU	mC*mA*mG *GUUCAG GCAUGCU GGGCGUU UUAGAmG mCmUmAm GmAmAmA mUmAmGm CAAGUUA AAAUAAG GCUAGUC CGUUAUC AmAmCmU mUmGmAm AmAmAmA mGmUmGm GmCmAmC mCmGmAm GmUmCmG mGmUmGm CmU*mU*m	chr16:10903848-10903868

					U*mU	
G016070	70	онРНК	UUUCCAAGGACUUCAGCUGG	UUUCCAAGGACUUCAGCUGGGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU	mU*mU*mU*CCAAGGACUUCAGCUGGGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	chr16:10916432-10916452
G016071	71	онРНК	AGGCCGAGGAGGCUGGAAUU	AGGCCGAGGAGGCUGGAAUUGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGC	mA*mG*mG*CCGAGGAGGCUGGAAUUGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUC	chr16:10907935-10907955

				UUUU	AmAmCmU mUmGmAm AmAmAmA mGmUmGm GmCmAmC mCmGmAm GmUmCmG mGmUmGm CmU*mU*m U*mU	
G016072	72	онРНК	CAGUGG CUGAUG GAGCGA AG	CAGUGGCU GAUGGAGC GAAGGUUU UAGAGCUA GAAAUAGC AAGUUAAA AUAAGGCU AGUCCGUU AUCAACUU GAAAAAGU GGCACCGA GUCGGUGC UUUU	mC*mA*mG *UGGCUG AUGGAGC GAAGGUU UUAGAmG mCmUmAm GmAmAmA mUmAmGm CAAGUUA AAAUAAG GCUAGUC CGUUAUC AmAmCmU mUmGmAm AmAmAmA mGmUmGm GmCmAmC mCmGmAm GmUmCmG mGmUmGm CmU*mU*m U*mU	chr16:10903 824- 10903844
G016073	73	онРНК	GGGAUG CAGCGA GCGAAG	GGGAUGCA GCGAGCGA AGGCGUUU	mG*mG*m G*AUGCA GCGAGCG	chr16:10918 493- 10918513

			GC	UAGAGCUA GAAAUAGC AAGUUAAA AUAAGGCU AGUCCGUU AUCAACUU GAAAAAGU GGCACCGA GUCGGUGC UUUU	AAGGCGU UUUAGAm GmCmUmA mGmAmAm AmUmAmG mCAAGUU AAAAUAA GGCUAGU CCGUUAU CAmAmCm UmUmGmA mAmAmAm AmGmUmG mGmCmAm CmCmGmA mGmUmCm GmGmUmG mCmU*mU* mU*mU	
G016074	74	онРНК	AAGCUG CCCUCC ACGCUC AC	AAGCUGCC CUCCACGCU CACGUUUU AGAGCUAG AAAUAGCA AGUUAAAA UAAGGCUA GUCCGUUA UCAACUUG AAAAAGUG GCACCGAG UCGGUGCU UUU	mA*mA*m G*CUGCCC UCCACGC UCACGUU UUAGAmG mCmUmAm GmAmAmA mUmAmGm CAAGUUA AAAUAAG GCUAGUC CGUUAUC AmAmCmU mUmGmAm AmAmAmA mGmUmGm	chr16:10907385-10907405

					GmCmAmC mCmGmAm GmUmCmG mGmUmGm CmU*mU*m U*mU	
G016075	75	онРНК	UUCCUC CUGCAA UGCUUC CU	UUCCUCCU GCAAUGCU UCCUGUUU UAGAGCUA GAAAUAGC AAGUUAAA AUAAGGCU AGUCCGUU AUCAACUU GAAAAAGU GGCACCGA GUCGGUGC UUUU	mU*mU*mC *CUCCUGC AAUGCUU CCUGUUU UAGAmGm CmUmAmG mAmAmAm UmAmGmC AAGUUAA AAUAAGG CUAGUCC GUUAUCA mAmCmUm UmGmAmA mAmAmAm GmUmGmG mCmAmCm CmGmAmG mUmCmGm GmUmGmC mU*mU*m U*mU	chr16:10907 622-10907642
G016076	76	онРНК	UCCUCC UGCAAU GCUUCC UG	UCCUCCUGC AAUGCUUC CUGGUUUU AGAGCUAG AAAUAGCA AGUUAAAA UAAGGCUA	mU*mC*mC *UCCUGCA AUGCUUC CUGGUUU UAGAmGm CmUmAmG mAmAmAm	chr16:10907 623-10907643

				GUCCGUUA UCAACUUG AAAAAGUG GCACCGAG UCGGUGCU UUU	UmAmGmC AAGUUAA AAUAAGG CUAGUCC GUUAUCA mAmCmUm UmGmAmA mAmAmAm GmUmGmG mCmAmCm CmGmAmG mUmCmGm GmUmGmC mU*mU*m U*mU	
G016077	77	онРНК	CAAGCU GCCCUC CACGCU CA	CAAGCUGC CCUCCACGC UCAGUUUU AGAGCUAG AAAUAGCA AGUUAAAA UAAGGCUA GUCCGUUA UCAACUUG AAAAAGUG GCACCGAG UCGGUGCU UUU	mC*mA*mA *GCUGCCC UCCACGC UCAGUUU UAGAmGm CmUmAmG mAmAmAm UmAmGmC AAGUUAA AAUAAGG CUAGUCC GUUAUCA mAmCmUm UmGmAmA mAmAmAm GmUmGmG mCmAmCm CmGmAmG mUmCmGm GmUmGmC	chr16:10907 384- 10907404

					mU*mU*mU*mU	
G016078	78	онРНК	UCCCUGGACCUCCGCAGCAC	UCCCUGGACCUCCGCAGCACGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU	mU*mC*mC*CUGGACCUCCGCAGCACGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	chr16:10908069-10908089
G016079	79	онРНК	UCCAGCCUCCUCGGCCUCGU	UCCAGCCUCCUCGGCCUCGUGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAGUGGCACCGAGU	mU*mC*mC*AGCCUCCUCGGCCUCGUGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCC	chr16:10907932-10907952

				CGGUGCUUUU	GUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	
G016080	80	онРНК	CUUCUCCAGCCAGGUCCAUC	CUUCUCCAGCCAGGUCCAUCGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU	mC*mU*mU*CUCCAGCCAGGUCCAUCGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	chr16:10895387-10895407
G016081	81	онРНК	CUUCCUCCUGCA	CUUCCUCCUGCAAUGCU	mC*mU*mU*CCUCCUG	chr16:10907621-

			AUGCUU CC	UCCGUUUU AGAGCUAG AAAUAGCA AGUUAAAA UAAGGCUA GUCCGUUA UCAACUUG AAAAAGUG GCACCGAG UCGGUGCU UUU	CAAUGCU UCCGUUU UAGAmGm CmUmAmG mAmAmAm UmAmGmC AAGUUAA AAUAAGG CUAGUCC GUUAUCA mAmCmUm UmGmAmA mAmAmAm GmUmGmG mCmAmCm CmGmAmG mUmCmGm GmUmGmC mU*mU*m U*mU	10907641
G016082	82	онРНК	CGUCCU CCCCAA GCUCCA GC	CGUCCUCCC CAAGCUCC AGCGUUUU AGAGCUAG AAAUAGCA AGUUAAAA UAAGGCUA GUCCGUUA UCAACUUG AAAAAGUG GCACCGAG UCGGUGCU UUU	mC*mG*mU *CCUCCCC AAGCUCC AGCGUUU UAGAmGm CmUmAmG mAmAmAm UmAmGmC AAGUUAA AAUAAGG CUAGUCC GUUAUCA mAmCmUm UmGmAmA mAmAmAm	chr16:10907 363- 10907383

					GmUmGmG mCmAmCm CmGmAmG mUmCmGm GmUmGmC mU*mU*m U*mU	
G016083	83	онРНК	CCAGCU CCUCGA AGCCGU CU	CCAGCUCCU CGAAGCCG UCUGUUUU AGAGCUAG AAAUAGCA AGUUAAAA UAAGGCUA GUCCGUUA UCAACUUG AAAAAGUG GCACCGAG UCGGUGCU UUU	mC*mC*mA *GCUCCUC GAAGCCG UCUGUUU UAGAmGm CmUmAmG mAmAmAm UmAmGmC AAGUUAA AAUAAGG CUAGUCC GUUAUCA mAmCmUm UmGmAmA mAmAmAm GmUmGmG mCmAmCm CmGmAmG mUmCmGm GmUmGmC mU*mU*m U*mU	chr16:10906 985- 10907005
G016084	84	онРНК	CUUUUC CUCCCU GCAGCA UC	CUUUUCCU CCCUGCAGC AUCGUUUU AGAGCUAG AAAUAGCA AGUUAAAA	mC*mU*mU *UUCCUCC CUGCAGC AUCGUUU UAGAmGm CmUmAmG	chr16:10915 626- 10915646

				UAAGGCUA GUCCGUUA UCAACUUG AAAAAGUG GCACCGAG UCGGUGCU UUU	mAmAmAm UmAmGmC AAGUUAA AAUAAGG CUAGUCC GUUAUCA mAmCmUm UmGmAmA mAmAmAm GmUmGmG mCmAmCm CmGmAmG mUmCmGm GmUmGmC mU*mU*m U*mU	
G016085	85	онРНК	CGGCCG CCACGA GUGGCU GU	CGGCCGCCA CGAGUGGC UGUGUUUU AGAGCUAG AAAUAGCA AGUUAAAA UAAGGCUA GUCCGUUA UCAACUUG AAAAAGUG GCACCGAG UCGGUGCU UUU	mC*mG*mG *CCGCCAC GAGUGGC UGUGUUU UAGAmGm CmUmAmG mAmAmAm UmAmGmC AAGUUAA AAUAAGG CUAGUCC GUUAUCA mAmCmUm UmGmAmA mAmAmAm GmUmGmG mCmAmCm CmGmAmG mUmCmGm	chr16:10906913-10906933

					GmUmGmC mU*mU*m U*mU	
G016086	86	онРНК	CGCCCA GGUCCU CACGUC UG	CGCCCAGG UCCUCACG UCUGGUUU UAGAGCUA GAAAUAGC AAGUUAAA AUAAGGCU AGUCCGUU AUCAACUU GAAAAAGU GGCACCGA GUCGGUGC UUUU	mC*mG*mC *CCAGGUC CUCACGU CUGGUUU UAGAmGm CmUmAmG mAmAmAm UmAmGmC AAGUUAA AAUAAGG CUAGUCC GUUAUCA mAmCmUm UmGmAmA mAmAmAm GmUmGmG mCmAmCm CmGmAmG mUmCmGm GmUmGmC mU*mU*m U*mU	chr16:10907 539- 10907559
G016087	87	онРНК	CACGUG CGGACC GGCACC GG	CACGUGCG GACCGGCA CCGGGUUU UAGAGCUA GAAAUAGC AAGUUAAA AUAAGGCU AGUCCGUU AUCAACUU GAAAAAGU	mC*mA*mC *GUGCGG ACCGGCA CCGGGUU UUAGAmG mCmUmAm GmAmAmA mUmAmGm CAAGUUA AAAUAAG	chr16:10907 030- 10907050

				GGCACCGA GUCGGUGC UUUU	GCUAGUC CGUUAUC AmAmCmU mUmGmAm AmAmAmA mGmUmGm GmCmAmC mCmGmAm GmUmCmG mGmUmGm CmU*mU*m U*mU	
G016088	88	онРНК	CAGCUU GGCCAG CUCUGC CA	CAGCUUGG CCAGCUCU GCCAGUUU UAGAGCUA GAAAUAGC AAGUUAAA AUAAGGCU AGUCCGUU AUCAACUU GAAAAAGU GGCACCGA GUCGGUGC UUUU	mC*mA*mG *CUUGGCC AGCUCUG CCAGUUU UAGAmGm CmUmAmG mAmAmAm UmAmGmC AAGUUAA AAUAAGG CUAGUCC GUUAUCA mAmCmUm UmGmAmA mAmAmAm GmUmGmG mCmAmCm CmGmAmG mUmCmGm GmUmGmC mU*mU*m U*mU	chr16:10907 461- 10907481
G016089	89	онРНК	UCGGAC	UCGGACUC	mU*mC*mG	chr16:10907

			UCUGCG GCCCGC GG	UGCGGCCC GCGGGUUU UAGAGCUA GAAAUAGC AAGUUAAA AUAAGGCU AGUCCGUU AUCAACUU GAAAAAGU GGCACCGA GUCGGUGC UUUU	*GACUCUG CGGCCCG CGGGUUU UAGAmGm CmUmAmG mAmAmAm UmAmGmC AAGUUAA AAUAAGG CUAGUCC GUUAUCA mAmCmUm UmGmAmA mAmAmAm GmUmGmG mCmAmCm CmGmAmG mUmCmGm GmUmGmC mU*mU*m U*mU	586-10907606
G016090	90	онРНК	CUUCCC CCAGCU GAAGUC CU	CUUCCCCCA GCUGAAGU CCUGUUUU AGAGCUAG AAAUAGCA AGUUAAAA UAAGGCUA GUCCGUUA UCAACUUG AAAAAGUG GCACCGAG UCGGUGCU UUU	mC*mU*mU *CCCCCAG CUGAAGU CCUGUUU UAGAmGm CmUmAmG mAmAmAm UmAmGmC AAGUUAA AAUAAGG CUAGUCC GUUAUCA mAmCmUm UmGmAmA	chr16:10916426-10916446

					mAmAmAm GmUmGmG mCmAmCm CmGmAmG mUmCmGm GmUmGmC mU*mU*m U*mU	
G016091	91	онРНК	GCCCAG CUCCCA GGCCAG CU	GCCCAGCUC CCAGGCCA GCUGUUUU AGAGCUAG AAAUAGCA AGUUAAAA UAAGGCUA GUCCGUUA UCAACUUG AAAAAGUG GCACCGAG UCGGUGCU UUU	mG*mC*mC *CAGCUCC CAGGCCA GCUGUUU UAGAmGm CmUmAmG mAmAmAm UmAmGmC AAGUUAA AAUAAGG CUAGUCC GUUAUCA mAmCmUm UmGmAmA mAmAmAm GmUmGmG mCmAmCm CmGmAmG mUmCmGm GmUmGmC mU*mU*m U*mU	chr16:10907476-10907496
G016092	92	онРНК	CCCUCC AGCCAG UUGUCA UA	CCCUCCAGC CAGUUGUC AUAGUUUU AGAGCUAG AAAUAGCA	mC*mC*mC *UCCAGCC AGUUGUC AUAGUUU UAGAmGm	chr16:10907730-10907750

				AGUUAAAA UAAGGCUA GUCCGUUA UCAACUUG AAAAAGUG GCACCGAG UCGGUGCU UUU	CmUmAmG mAmAmAm UmAmGmC AAGUUAA AAUAAGG CUAGUCC GUUAUCA mAmCmUm UmGmAmA mAmAmAm GmUmGmG mCmAmCm CmGmAmG mUmCmGm GmUmGmC mU*mU*m U*mU	
G016093	93	онРНК	GCCCUC CAGCCA GUUGUC AU	GCCCUCCAG CCAGUUGU CAUGUUUU AGAGCUAG AAAUAGCA AGUUAAAA UAAGGCUA GUCCGUUA UCAACUUG AAAAAGUG GCACCGAG UCGGUGCU UUU	mG*mC*mC *CUCCAGC CAGUUGU CAUGUUU UAGAmGm CmUmAmG mAmAmAm UmAmGmC AAGUUAA AAUAAGG CUAGUCC GUUAUCA mAmCmUm UmGmAmA mAmAmAm GmUmGmG mCmAmCm CmGmAmG	chr16:10907731-10907751

					mUmCmGm GmUmGmC mU*mU*m U*mU	
G016094	94	онРНК	CCCUGA CGCUCC UCCGGG AC	CCCUGACGC UCCUCCGG GACGUUUU AGAGCUAG AAAUAGCA AGUUAAAA UAAGGCUA GUCCGUUA UCAACUUG AAAAAGUG GCACCGAG UCGGUGCU UUU	mC*mC*mC *UGACGCU CCUCCGG GACGUUU UAGAmGm CmUmAmG mAmAmAm UmAmGmC AAGUUAA AAUAAGG CUAGUCC GUUAUCA mAmCmUm UmGmAmA mAmAmAm GmUmGmG mCmAmCm CmGmAmG mUmCmGm GmUmGmC mU*mU*m U*mU	chr16:10907 272- 10907292
G016095	95	онРНК	CACACU GCCCGG CACAAA GU	CACACUGCC CGGCACAA AGUGUUUU AGAGCUAG AAAUAGCA AGUUAAAA UAAGGCUA GUCCGUUA UCAACUUG	mC*mA*mC *ACUGCCC GGCACAA AGUGUUU UAGAmGm CmUmAmG mAmAmAm UmAmGmC AAGUUAA	chr16:10907 325- 10907345

				AAAAAGUG GCACCGAG UCGGUGCU UUU	AAUAAGG CUAGUCC GUUAUCA mAmCmUm UmGmAmA mAmAmAm GmUmGmG mCmAmCm CmGmAmG mUmCmGm GmUmGmC mU*mU*m U*mU	
G016096	96	онРНК	CAGCUC ACAGUG UGCCAC CA	CAGCUCAC AGUGUGCC ACCAGUUU UAGAGCUA GAAAUAGC AAGUUAAA AUAAGGCU AGUCCGUU AUCAACUU GAAAAAGU GGCACCGA GUCGGUGC UUUU	mC*mA*mG *CUCACAG UGUGCCA CCAGUUU UAGAmGm CmUmAmG mAmAmAm UmAmGmC AAGUUAA AAUAAGG CUAGUCC GUUAUCA mAmCmUm UmGmAmA mAmAmAm GmUmGmG mCmAmCm CmGmAmG mUmCmGm GmUmGmC mU*mU*m U*mU	chr16:10895 282-10895302

G016097	97	онРНК	AGCUCGGACUCUGCGGCCCG	AGCUCGGACUCUGCGGCCCGGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU	mA*mG*mC*UCGGACUCUGCGGCCCGGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmGmGmCmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	chr16:10907589-10907609
G016098	98	онРНК	GACGCCCUAUUUGAGCUGUC	GACGCCCUAUUUGAGCUGUCGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU	mG*mA*mC*GCCCUAUUUGAGCUGUCGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUm	chr16:10907172-10907192

					UmGmAmA mAmAmAm GmUmGmG mCmAmCm CmGmAmG mUmCmGm GmUmGmC mU*mU*m U*mU	
G016099	99	онРНК	GCCAGU GCUGCG GAGGUC CA	GCCAGUGC UGCGGAGG UCCAGUUU UAGAGCUA GAAAUAGC AAGUUAAA AUAAGGCU AGUCCGUU AUCAACUU GAAAAAGU GGCACCGA GUCGGUGC UUUU	mG*mC*mC *AGUGCU GCGGAGG UCCAGUU UUAGAmG mCmUmAm GmAmAmA mUmAmGm CAAGUUA AAAUAAG GCUAGUC CGUUAUC AmAmCmU mUmGmAm AmAmAmA mGmUmGm GmCmAmC mCmGmAm GmUmCmG mGmUmGm CmU*mU*m U*mU	chr16:10908 073- 10908093
G016100	100	онРНК	AGGGCU CCCAGG CAGCGG GC	AGGGCUCC CAGGCAGC GGGCGUUU UAGAGCUA	mA*mG*m G*GCUCCC AGGCAGC GGGCGUU	chr16:10907 790- 10907810

				GAAAUAGC AAGUUAAA AUAAGGCU AGUCCGUU AUCAACUU GAAAAAGU GGCACCGA GUCGGUGC UUUU	UUAGAmG mCmUmAm GmAmAmA mUmAmGm CAAGUUA AAAUAAG GCUAGUC CGUUAUC AmAmCmU mUmGmAm AmAmAmA mGmUmGm GmCmAmC mCmGmAm GmUmCmG mGmUmGm CmU*mU*m U*mU	
G016101	101	онРНК	GCCGAG CCCGCA GGCCCG GA	GCCGAGCCC GCAGGCCC GGAGUUUU AGAGCUAG AAAUAGCA AGUUAAAA UAAGGCUA GUCCGUUA UCAACUUG AAAAAGUG GCACCGAG UCGGUGCU UUU	mG*mC*mC *GAGCCCG CAGGCCC GGAGUUU UAGAmGm CmUmAmG mAmAmAm UmAmGmC AAGUUAA AAUAAGG CUAGUCC GUUAUCA mAmCmUm UmGmAmA mAmAmAm GmUmGmG mCmAmCm	chr16:10906 542- 10906562

					CmGmAmG mUmCmGm GmUmGmC mU*mU*m U*mU	
G016102	102	онРНК	GCUCCC AGGCAG CGGGCG GG	GCUCCCAG GCAGCGGG CGGGGUUU UAGAGCUA GAAAUAGC AAGUUAAA AUAAGGCU AGUCCGUU AUCAACUU GAAAAAGU GGCACCGA GUCGGUGC UUUU	mG*mC*mU *CCCAGGC AGCGGGC GGGGUUU UAGAmGm CmUmAmG mAmAmAm UmAmGmC AAGUUAA AAUAAGG CUAGUCC GUUAUCA mAmCmUm UmGmAmA mAmAmAm GmUmGmG mCmAmCm CmGmAmG mUmCmGm GmUmGmC mU*mU*m U*mU	chr16:10907 787- 10907807
G016103	103	онРНК	CCUCUC CAGCUG CCGGGC AU	CCUCUCCAG CUGCCGGG CAUGUUUU AGAGCUAG AAAUAGCA AGUUAAAA UAAGGCUA GUCCGUUA	mC*mC*mU *CUCCAGC UGCCGGG CAUGUUU UAGAmGm CmUmAmG mAmAmAm UmAmGmC	chr16:10904 765- 10904785

				UCAACUUG AAAAAGUG GCACCGAG UCGGUGCU UUU	AAGUUAA AAUAAGG CUAGUCC GUUAUCA mAmCmUm UmGmAmA mAmAmAm GmUmGmG mCmAmCm CmGmAmG mUmCmGm GmUmGmC mU*mU*m U*mU	
G016104	104	онРНК	AGGCUU UCCCCA AACUGG UG	AGGCUUUC CCCAAACU GGUGGUUU UAGAGCUA GAAAUAGC AAGUUAAA AUAAGGCU AGUCCGUU AUCAACUU GAAAAAGU GGCACCGA GUCGGUGC UUUU	mA*mG*m G*CUUUCC CCAAACU GGUGGUU UUAGAmG mCmUmAm GmAmAmA mUmAmGm CAAGUUA AAAUAAG GCUAGUC CGUUAUC AmAmCmU mUmGmAm AmAmAmA mGmUmGm GmCmAmC mCmGmAm GmUmCmG mGmUmGm CmU*mU*m	chr16:10915592-10915612

					U*mU	
G016105	105	онРНК	CCAUCUCCACUCUGCCCCAU	CCAUCUCCACUCUGCCCCAUGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU	mC*mC*mA*UCUCCACUCUGCCCCAUGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmUmU*mU*mU*mU	chr16:10902723-10902743
G016106	106	онРНК	UCCUCCUCACAGCCCGGCCC	UCCUCCUCACAGCCCGGCCCGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUU	mU*mC*mC*UCCUCACAGCCCGGCCCGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCA	chr16:10907119-10907139

				UU	mAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	
G016107	107	онРНК	CCACUCUGCCCCAUGGGCUC	CCACUCUGCCCCAUGGGCUCGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU	mC*mC*mA*CUCUGCCCCAUGGGCUCGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	chr16:10902729-10902749
G016108	108	онРНК	CAGCCUCCCGCCCGCUGCC	CAGCCUCCCGCCCGCUGCCUGUUUUA	mC*mA*mG*CCUCCCGCCCGCUG	chr16:10907781-10907801

			U	GAGCUAGA AAUAGCAA GUUAAAAU AAGGCUAG UCCGUUAU CAACUUGA AAAAGUGG CACCGAGU CGGUGCUU UU	CCUGUUU UAGAmGm CmUmAmG mAmAmAm UmAmGmC AAGUUAA AAUAAGG CUAGUCC GUUAUCA mAmCmUm UmGmAmA mAmAmAm GmUmGmG mCmAmCm CmGmAmG mUmCmGm GmUmGmC mU*mU*m U*mU	
G016109	109	онРНК	CCCGGC CGCCUC UCUUUU CU	CCCGGCCGC CUCUCUUU UCUGUUUU AGAGCUAG AAAUAGCA AGUUAAAA UAAGGCUA GUCCGUUA UCAACUUG AAAAAGUG GCACCGAG UCGGUGCU UUU	mC*mC*mC *GGCCGCC UCUCUUU UCUGUUU UAGAmGm CmUmAmG mAmAmAm UmAmGmC AAGUUAA AAUAAGG CUAGUCC GUUAUCA mAmCmUm UmGmAmA mAmAmAm GmUmGmG	chr16:10907979-10907999

					mCmAmCm CmGmAmG mUmCmGm GmUmGmC mU*mU*m U*mU	
G016110	110	онРНК	CCUGGG CCCACA GCCACU CG	CCUGGGCCC ACAGCCAC UCGGUUUU AGAGCUAG AAAUAGCA AGUUAAAA UAAGGCUA GUCCGUUA UCAACUUG AAAAAGUG GCACCGAG UCGGUGCU UUU	mC*mC*mU *GGGCCCA CAGCCAC UCGGUUU UAGAmGm CmUmAmG mAmAmAm UmAmGmC AAGUUAA AAUAAGG CUAGUCC GUUAUCA mAmCmUm UmGmAmA mAmAmAm GmUmGmG mCmAmCm CmGmAmG mUmCmGm GmUmGmC mU*mU*m U*mU	chr16:10906 904- 10906924
G016111	111	онРНК	UCCCCG GCUGCA GCCGCU UC	UCCCCGGCU GCAGCCGC UUCGUUUU AGAGCUAG AAAUAGCA AGUUAAAA UAAGGCUA	mU*mC*mC *CCGGCUG CAGCCGC UUCGUUU UAGAmGm CmUmAmG mAmAmAm	chr16:10907 870- 10907890

				GUCCGUUA UCAACUUG AAAAAGUG GCACCGAG UCGGUGCU UUU	UmAmGmC AAGUUAA AAUAAGG CUAGUCC GUUAUCA mAmCmUm UmGmAmA mAmAmAm GmUmGmG mCmAmCm CmGmAmG mUmCmGm GmUmGmC mU*mU*m U*mU	
G016112	112	онРНК	CGCGUU CUGCUC AUCCUA GA	CGCGUUCU GCUCAUCC UAGAGUUU UAGAGCUA GAAAUAGC AAGUUAAA AUAAGGCU AGUCCGUU AUCAACUU GAAAAAGU GGCACCGA GUCGGUGC UUUU	mC*mG*mC *GUUCUGC UCAUCCU AGAGUUU UAGAmGm CmUmAmG mAmAmAm UmAmGmC AAGUUAA AAUAAGG CUAGUCC GUUAUCA mAmCmUm UmGmAmA mAmAmAm GmUmGmG mCmAmCm CmGmAmG mUmCmGm GmUmGmC	chr16:10906 968- 10906988

					mU*mU*m U*mU	
G016113	113	онРНК	UUCCAC AUCCUU CAGGGA CU	UUCCACAU CCUUCAGG GACUGUUU UAGAGCUA GAAAUAGC AAGUUAAA AUAAGGCU AGUCCGUU AUCAACUU GAAAAAGU GGCACCGA GUCGGUGC UUUU	mU*mU*mC *CACAUCC UUCAGGG ACUGUUU UAGAmGm CmUmAmG mAmAmAm UmAmGmC AAGUUAA AAUAAGG CUAGUCC GUUAUCA mAmCmUm UmGmAmA mAmAmAm GmUmGmG mCmAmCm CmGmAmG mUmCmGm GmUmGmC mU*mU*m U*mU	chr16:10909 138- 10909158
G016114	114	онРНК	CUCUCC AGCUGC CGGGCA UU	CUCUCCAGC UGCCGGGC AUUGUUUU AGAGCUAG AAAUAGCA AGUUAAAA UAAGGCUA GUCCGUUA UCAACUUG AAAAAGUG GCACCGAG	mC*mU*mC *UCCAGCU GCCGGGC AUUGUUU UAGAmGm CmUmAmG mAmAmAm UmAmGmC AAGUUAA AAUAAGG CUAGUCC	chr16:10904 764- 10904784

				UCGGUGCUUUU	GUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	
G016115	115	онРНК	GGGCCCACAGCCACUCGUGG	GGGCCCACAGCCACUCGUGGGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU	mG*mG*mG*CCCACAGCCACUCGUGGGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	chr16:10906907-10906927
G016116	116	онРНК	CCCCGGCCGCCU	CCCCGGCCGCCUCUCUU	mC*mC*mC*CGGCCGC	chr16:10907978-

			CUCUUU UC	UUCGUUUU AGAGCUAG AAAUAGCA AGUUAAAA UAAGGCUA GUCCGUUA UCAACUUG AAAAAGUG GCACCGAG UCGGUGCU UUU	CUCUCUU UUCGUUU UAGAmGm CmUmAmG mAmAmAm UmAmGmC AAGUUAA AAUAAGG CUAGUCC GUUAUCA mAmCmUm UmGmAmA mAmAmAm GmUmGmG mCmAmCm CmGmAmG mUmCmGm GmUmGmC mU*mU*m U*mU	10907998
G016117	117	онРНК	UCCAGC UGCCGG GCAUUG GG	UCCAGCUG CCGGGCAU UGGGGUUU UAGAGCUA GAAAUAGC AAGUUAAA AUAAGGCU AGUCCGUU AUCAACUU GAAAAAGU GGCACCGA GUCGGUGC UUUU	mU*mC*mC *AGCUGCC GGGCAUU GGGGUUU UAGAmGm CmUmAmG mAmAmAm UmAmGmC AAGUUAA AAUAAGG CUAGUCC GUUAUCA mAmCmUm UmGmAmA mAmAmAm	chr16:10904 761- 10904781

					GmUmGmG mCmAmCm CmGmAmG mUmCmGm GmUmGmC mU*mU*m U*mU	

[00156] Термины «mA», «mC», «mU» или «mG» могут применятся для обозначения нуклеотида, модифицированного 2'-O-Me.

[00157] В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит направляющую последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1-117. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит направляющую последовательность, которая представляет собой по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 1-117. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит направляющую последовательность, которая по меньшей мере на 95%, 90% или 85% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 1-117. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит направляющую последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 1-117. В некоторых вариантах осуществления, раскрытых в данном документе, направляющая последовательность представляет собой (i) направляющую последовательность SEQ ID NO: 32, 64, 67, 68, 74, 76, 84, 86, 90, 91 или 115; ii) по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 последовательных нуклеотидов последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 32, 64, 67, 68, 74, 76, 84, 86, 90, 91 и 115; ii) направляющей последовательности, на по меньшей мере 95%, 90% или 85% идентичной последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 32, 64, 67, 68, 74, 76, 84, 86, 90, 91 и 115.

[00158] В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит направляющую последовательность, которая содержит по меньшей мере 10 смежных нуклеотидов ± 10 нуклеотидов в пределах геномных координат, указанных в **Таблице 2**. В контексте данного документа термин «по меньшей мере 10 смежных нуклеотидов ± 10 нуклеотидов в пределах геномных координат» означает, например, по меньшей мере 10 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат, где геномные координаты включают 10 нуклеотидов в 5'-направлении и 10 нуклеотидов в 3'-направлении из диапазонов, перечисленных в **Таблице 2**. Например, CIITA-направленная РНК может содержать 10 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат chr16:10877360-10877380 или в пределах chr16:10877350-10877390, включая граничные нуклеотиды этих диапазонов. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит направляющую последовательность, которая представляет собой по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов последовательности, содержащей 10 смежных

нуклеотидов ± 10 нуклеотидов геномных координат, указанных в **Таблице 2**. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит направляющую последовательность, которая по меньшей мере на 95%, 90% или 85% идентична последовательности, выбранной из последовательности, состоящей из 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов последовательности, содержащей 10 смежных нуклеотидов ± 10 нуклеотидов геномных координат, указанных в **Таблице 2**.

[00159] В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит направляющую последовательность, которая содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов ± 10 нуклеотидов в пределах геномных координат, указанных в **Таблице 2**. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит направляющую последовательность, которая содержит по меньшей мере 20 смежных нуклеотидов ± 10 нуклеотидов в пределах геномных координат, указанных в **Таблице 2**.

[00160] В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 3. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 4. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 6. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 7. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 8. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 9. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 10. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 11. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 12. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 14. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 15. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 16. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 17. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 18. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 19. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 20. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 21. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 22. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 23. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 24. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 25. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 26. В некоторых

вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 27. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 28. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 29. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 30. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 31. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 32. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 33. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 34. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 35. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 36. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 37. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 38. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 39. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 40. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 41. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 42. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 43. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 44. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 45. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 46. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 47. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 48. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 49. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 50. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 51. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 52. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 53. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 54. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 55. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 56. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 57. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 58. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 59. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 60. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 61. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 62. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID

NO: 63. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 64. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 65. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 66. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 67. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 68. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 69. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 70. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 71. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 72. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 73. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 74. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 75. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 76. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 77. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 78. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 79. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 80. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 81. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 82. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 83. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 84. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 85. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 86. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 87. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 88. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 89. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 90. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 91. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 92. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 93. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 94. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 95. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 96. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 97. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 98. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 99. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная

РНК содержит SEQ ID NO: 100. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 101. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 102. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 103. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 104. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 105. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 106. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 107. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 108. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 109. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 110. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 111. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 112. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 113. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 114. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 115. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 116. В некоторых вариантах осуществления CIITA-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 117.

[00161] В данном документе предложены дополнительные варианты осуществления CIITA-направленная РНК, включая, *например*, иллюстративные модификации направляющей РНК.

2. Генетические модификации CIITA

[00162] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения способы и композиции, описанные в настоящем документе, генетически модифицируют по меньшей мере один нуклеотид экзона в гене CIITA в клетке. Поскольку белок CIITA регулирует экспрессию MHC класса II, в некоторых вариантах осуществления генетическая модификация CIITA изменяет продукцию белка CIITA и тем самым снижает экспрессию белка MHC класса II на поверхности генетически модифицированной клетки (или сконструированной клетки). Генетические модификации охватывают популяцию модификаций, возникающих в результате контакта с системой редактирования генов (*например*, совокупность редактирований, возникающих в результате действия Cas9 и CIITA-направленной РНК, или совокупность редактирований, возникающих в результате действия BC22 и CIITA-направленной РНК).

[00163] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения генетическая модификация включает по меньшей мере один нуклеотид экзона, который пределах геномных координат chr16: 10902662-chr16:10923285. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения генетическая модификация включает по меньшей мере один нуклеотид экзона, который пределах геномных координат chr16:10906542-

chr16:10923285. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения генетическая модификация включает по меньшей мере один нуклеотид экзона, который пределах геномных координат chr16:10906542-chr16:10908121. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения генетическая модификация включает по меньшей мере один нуклеотид экзона, который пределах геномных координат выбранных из: chr16:10916432-10916452, chr16:10922444-10922464, chr16:10907924-10907944, chr16:10906985-10907005, chr16:10908073-10908093, chr16:10907433-10907453, chr16:10907979-10907999, chr16:10907139-10907159, chr16:10922435-10922455, chr16:10907384-10907404, chr16:10907434-10907454, chr16:10907119-10907139, chr16:10907539-10907559, chr16:10907810-10907830, chr16:10907315-10907335, chr16:10916426-10916446, chr16:10909138-10909158, chr16:10908101-10908121, chr16:10907790-10907810, chr16:10907787-10907807, chr16:10907454-10907474, chr16:10895702-10895722, chr16:10902729-10902749, chr16:10918492-10918512, chr16:10907932-10907952, chr16:10907623-10907643, chr16:10907461-10907481, chr16:10902723-10902743, chr16:10907622-10907642, chr16:10922441-10922461, chr16:10902662-10902682, chr16:10915626-10915646, chr16:10915592-10915612, chr16:10907385-10907405, chr16:10907030-10907050, chr16:10907935-10907955, chr16:10906853-10906873, chr16:10906757-10906777, chr16:10907730-10907750 и chr16:10895302-10895322. В некоторых вариантах осуществления генетическая модификация включает по меньшей мере один нуклеотид экзона в пределах геномных координат, выбранных из: chr16:10907539-10907559, chr16:10916426-10916446, chr16:10906907-10906927, chr16:10895702-10895722, chr16:10907757-10907777, chr16:10907623-10907643, chr16:10915626-10915646, chr16:10906756-10906776, chr16:10907476-10907496, chr16:10907385-10907405 и chr16:10923265-10923285. В некоторых вариантах осуществления генетическая модификация включает по меньшей мере один нуклеотид экзона в пределах геномных координат, выбранных из: chr16:10906853-10906873, chr16:10922444-10922464, chr16:10907924-10907944, chr16:10907315-10907335, chr16:10916432-10916452, chr16:10907932-10907952, chr16:10915626-10915646, chr16:10907586-10907606, chr16:10916426-10916446, chr16:10907476-10907496, chr16:10907787-10907807, chr16:10907979-10907999, chr16:10906904-10906924 и chr16:10909138-10909158. В некоторых вариантах осуществления генетическая модификация включает по меньшей мере один нуклеотид экзона в пределах геномных координат, выбранных из: chr16:10895702-10895722, chr16:10916432-10916452, chr16:10907623-10907643, chr16:10907932-10907952, chr16:10906985-10907005, chr16:10915626-10915646, chr16:10907539-10907559, chr16:10916426-10916446, chr16:10907476-10907496, chr16:10907119-10907139, chr16:10907979-10907999 и chr16:10909138-10909158. В некоторых вариантах осуществления генетическая модификация включает по меньшей мере один нуклеотид экзона в пределах геномных координат, выбранных из: chr16:10906853-10906873, chr16:10906757-10906777, chr16:10895302-10895322, chr16:10907539-10907559,

chr16:10907730-10907750 и chr16:10895702-10895722. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения генетическая модификация включает по меньшей мере один нуклеотид экзона, который пределах геномных координат выбранных из: chr16:10906853-10906873, chr16:10922444-10922464, chr16:10916432-10916452. В некоторых вариантах осуществления генетическая модификация включает по меньшей мере один нуклеотид экзона в пределах геномных координат chr16:10906853-10906873. В некоторых вариантах осуществления генетическая модификация включает по меньшей мере один нуклеотид экзона в пределах геномных координат chr16:10922444-10922464. В некоторых вариантах осуществления генетическая модификация включает по меньшей мере один нуклеотид экзона, который пределах геномных координат chr16:10906757-10906777. В некоторых вариантах осуществления генетическая модификация включает по меньшей мере один нуклеотид экзона в пределах геномных координат chr16:10916432-10916452. В некоторых вариантах осуществления генетическая модификация включает по меньшей мере один нуклеотид экзона в пределах геномных координат chr16:10895302-10895322. В некоторых вариантах осуществления генетическая модификация включает по меньшей мере один нуклеотид экзона в пределах геномных координат chr16:10907539-10907559. В некоторых вариантах осуществления генетическая модификация включает по меньшей мере один нуклеотид экзона в пределах геномных координат chr16:10907730-10907750. В некоторых вариантах осуществления генетическая модификация включает по меньшей мере один нуклеотид экзона в пределах геномных координат chr16:10895702-10895722. В некоторых вариантах осуществления генетическая модификация включает по меньшей мере один нуклеотид экзона в пределах геномных координат chr16:10907932-10907952. В некоторых вариантах осуществления генетическая модификация включает по меньшей мере один нуклеотид экзона в пределах геномных координат chr16:10907476-10907496. В некоторых вариантах осуществления генетическая модификация включает по меньшей мере один нуклеотид экзона в пределах геномных координат chr16:10909138-10909158.

[00164] В некоторых вариантах осуществления генетическая модификация включает по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 6, по меньшей мере 7, по меньшей мере 8, по меньшей мере 9 или по меньшей мере 10 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат, выбранных из: chr16:10902662-10902682, chr16:10902723-10902743, chr16:10902729-10902749, chr16:10903747-10903767, chr16:10903824-10903844, chr16:10903848-10903868, chr16:10904761-10904781, chr16:10904764-10904784, chr16:10904765-10904785, chr16:10904785-10904805, chr16:10906542-10906562, chr16:10906556-10906576, chr16:10906609-10906629, chr16:10906610-10906630, chr16:10906616-10906636, chr16:10906682-10906702, chr16:10906756-10906776, chr16:10906757-10906777, chr16:10906821-10906841, chr16:10906823-10906843, chr16:10906847-10906867, chr16:10906848-10906868, chr16:10906853-10906873, chr16:10906853-10906873, chr16:10906904-10906924, chr16:10906907-10906927, chr16:10906913-10906933,

chr16:10906968-10906988, chr16:10906970-10906990, chr16:10906985-10907005, chr16:10907030-10907050, chr16:10907058-10907078, chr16:10907119-10907139, chr16:10907139-10907159, chr16:10907172-10907192, chr16:10907272-10907292, chr16:10907288-10907308, chr16:10907314-10907334, chr16:10907315-10907335, chr16:10907325-10907345, chr16:10907363-10907383, chr16:10907384-10907404, chr16:10907385-10907405, chr16:10907433-10907453, chr16:10907434-10907454, chr16:10907435-10907455, chr16:10907441-10907461, chr16:10907454-10907474, chr16:10907461-10907481, chr16:10907476-10907496, chr16:10907539-10907559, chr16:10907586-10907606, chr16:10907589-10907609, chr16:10907621-10907641, chr16:10907622-10907642, chr16:10907623-10907643, chr16:10907730-10907750, chr16:10907731-10907751, chr16:10907757-10907777, chr16:10907781-10907801, chr16:10907787-10907807, chr16:10907790-10907810, chr16:10907810-10907830, chr16:10907820-10907840, chr16:10907870-10907890, chr16:10907886-10907906, chr16:10907924-10907944, chr16:10907928-10907948, chr16:10907932-10907952, chr16:10907935-10907955, chr16:10907978-10907998, chr16:10907979-10907999, chr16:10908069-10908089, chr16:10908073-10908093, chr16:10908101-10908121, chr16:10909056-10909076, chr16:10909138-10909158, chr16:10910195-10910215, chr16:10910196-10910216, chr16:10915592-10915612, chr16:10915626-10915646, chr16:10916375-10916395, chr16:10916382-10916402, chr16:10916426-10916446, chr16:10916432-10916452, chr16:10918486-10918506, chr16:10918492-10918512, chr16:10918493-10918513, chr16:10922435-10922455, chr16:10922441-10922461, chr16:10922441-10922461, chr16:10922444-10922464, chr16:10922460-10922480, chr16:10923257-10923277 и chr16:10923265-10923285. В некоторых вариантах осуществления генетическая модификация включает по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 6, по меньшей мере 7, по меньшей мере 8, по меньшей мере 9 или по меньшей мере 10 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат, выбранных из: chr16:10916432-10916452, chr16:10922444-10922464, chr16:10907924-10907944, chr16:10906985-10907005, chr16:10908073-10908093, chr16:10907433-10907453, chr16:10907979-10907999, chr16:10907139-10907159, chr16:10922435-10922455, chr16:10907384-10907404, chr16:10907434-10907454, chr16:10907119-10907139, chr16:10907539-10907559, chr16:10907810-10907830, chr16:10907315-10907335, chr16:10916426-10916446, chr16:10909138-10909158, chr16:10908101-10908121, chr16:10907790-10907810, chr16:10907787-10907807, chr16:10907454-10907474, chr16:10895702-10895722, chr16:10902729-10902749, chr16:10918492-10918512, chr16:10907932-10907952, chr16:10907623-10907643, chr16:10907461-10907481, chr16:10902723-10902743, chr16:10907622-10907642, chr16:10922441-10922461, chr16:10902662-10902682, chr16:10915626-10915646, chr16:10915592-10915612, chr16:10907385-10907405, chr16:10907030-10907050, chr16:10907935-10907955, chr16:10906853-10906873, chr16:10906757-10906777, chr16:10907730-10907750 и chr16:10895302-10895322. В некоторых вариантах

осуществления генетическая модификация включает по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 6, по меньшей мере 7, по меньшей мере 8, по меньшей мере 9 или по меньшей мере 10 нуклеотидов экзона в пределах геномных координат, выбранных из: chr16:10907539-10907559, chr16:10916426-10916446, chr16:10906907-10906927, chr16:10895702-10895722, chr16:10907757-10907777, chr16:10907623-10907643, chr16:10915626-10915646, chr16:10906756-10906776, chr16:10907476-10907496, chr16:10907385-10907405 и chr16:10923265-10923285. В некоторых вариантах осуществления генетическая модификация включает по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 6, по меньшей мере 7, по меньшей мере 8, по меньшей мере 9 или по меньшей мере 10 нуклеотидов экзона в пределах геномных координат, выбранных из: chr16:10906853-10906873, chr16:10922444-10922464, chr16:10907924-10907944, chr16:10907315-10907335, chr16:10916432-10916452, chr16:10907932-10907952, chr16:10915626-10915646, chr16:10907586-10907606, chr16:10916426-10916446, chr16:10907476-10907496, chr16:10907787-10907807, chr16:10907979-10907999, chr16:10906904-10906924 и chr16:10909138-10909158. В некоторых вариантах осуществления генетическая модификация включает по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 6, по меньшей мере 7, по меньшей мере 8, по меньшей мере 9 или по меньшей мере 10 нуклеотидов экзона в пределах геномных координат, выбранных из: chr16:10895702-10895722, chr16:10916432-10916452, chr16:10907623-10907643, chr16:10907932-10907952, chr16:10906985-10907005, chr16:10915626-10915646, chr16:10907539-10907559, chr16:10916426-10916446, chr16:10907476-10907496, chr16:10907119-10907139, chr16:10907979-10907999 и chr16:10909138-10909158. В некоторых вариантах осуществления генетическая модификация включает по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 6, по меньшей мере 7, по меньшей мере 8, по меньшей мере 9 или по меньшей мере 10 нуклеотидов экзона в пределах геномных координат, выбранных из: chr16:10906853-10906873, chr16:10906757-10906777, chr16:10895302-10895322, chr16:10907539-10907559, chr16:10907730-10907750 и chr16:10895702-10895722. В некоторых вариантах осуществления генетическая модификация включает по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 6, по меньшей мере 7, по меньшей мере 8, по меньшей мере 9 или по меньшей мере 10 нуклеотидов экзона в пределах геномных координат, выбранных из: chr16:10906853-10906873, chr16:10922444-10922464, chr16:10916432-10916452. В некоторых вариантах осуществления генетическая модификация включает по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 6, по меньшей мере 7, по меньшей мере 8, по меньшей мере 9 или по меньшей мере 10 нуклеотидов экзона в пределах геномных координат chr16:10906853-10906873. В некоторых вариантах осуществления генетическая модификация включает по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 6, по меньшей мере 7, по меньшей мере 8, по меньшей

мере 9 или по меньшей мере 10 нуклеотидов экзона в пределах геномных координат chr16:10922444-10922464. В некоторых вариантах осуществления генетическая модификация включает по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 6, по меньшей мере 7, по меньшей мере 8, по меньшей мере 9 или по меньшей мере 10 нуклеотидов экзона в пределах геномных координат chr16:10906757-10906777. В некоторых вариантах осуществления генетическая модификация включает по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 6, по меньшей мере 7, по меньшей мере 8, по меньшей мере 9 или по меньшей мере 10 нуклеотидов экзона в пределах геномных координат chr16:10916432-10916452. В некоторых вариантах осуществления генетическая модификация включает по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 6, по меньшей мере 7, по меньшей мере 8, по меньшей мере 9 или по меньшей мере 10 нуклеотидов экзона в пределах геномных координат chr16:10895302-10895322. В некоторых вариантах осуществления генетическая модификация включает по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 6, по меньшей мере 7, по меньшей мере 8, по меньшей мере 9 или по меньшей мере 10 нуклеотидов экзона в пределах геномных координат chr16:10907539-10907559. В некоторых вариантах осуществления генетическая модификация включает по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 6, по меньшей мере 7, по меньшей мере 8, по меньшей мере 9 или по меньшей мере 10 нуклеотидов экзона в пределах геномных координат chr16:10907730-10907750. В некоторых вариантах осуществления генетическая модификация включает по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 6, по меньшей мере 7, по меньшей мере 8, по меньшей мере 9 или по меньшей мере 10 нуклеотидов экзона в пределах геномных координат chr16:10895702-10895722. В некоторых вариантах осуществления генетическая модификация включает по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 6, по меньшей мере 7, по меньшей мере 8, по меньшей мере 9 или по меньшей мере 10 нуклеотидов экзона в пределах геномных координат chr16:10907932-10907952. В некоторых вариантах осуществления генетическая модификация включает по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 6, по меньшей мере 7, по меньшей мере 8, по меньшей мере 9 или по меньшей мере 10 нуклеотидов экзона в пределах геномных координат chr16:10907476-10907496. В некоторых вариантах осуществления генетическая модификация включает по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 6, по меньшей мере 7, по меньшей мере 8, по меньшей мере 9 или по меньшей мере 10 нуклеотидов экзона в пределах геномных координат chr16:10909138-10909158.

[00165] В некоторых вариантах осуществления генетическая модификация включает по меньшей мере 5 последовательных нуклеотидов в пределах геномных

координат, выбранных из: chr16:10902662-10902682, chr16:10902723-10902743, chr16:10902729-10902749, chr16:10903747-10903767, chr16:10903824-10903844, chr16:10903848-10903868, chr16:10904761-10904781, chr16:10904764-10904784, chr16:10904765-10904785, chr16:10904785-10904805, chr16:10906542-10906562, chr16:10906556-10906576, chr16:10906609-10906629, chr16:10906610-10906630, chr16:10906616-10906636, chr16:10906682-10906702, chr16:10906756-10906776, chr16:10906757-10906777, chr16:10906821-10906841, chr16:10906823-10906843, chr16:10906847-10906867, chr16:10906848-10906868, chr16:10906853-10906873, chr16:10906853-10906873, chr16:10906904-10906924, chr16:10906907-10906927, chr16:10906913-10906933, chr16:10906968-10906988, chr16:10906970-10906990, chr16:10906985-10907005, chr16:10907030-10907050, chr16:10907058-10907078, chr16:10907119-10907139, chr16:10907139-10907159, chr16:10907172-10907192, chr16:10907272-10907292, chr16:10907288-10907308, chr16:10907314-10907334, chr16:10907315-10907335, chr16:10907325-10907345, chr16:10907363-10907383, chr16:10907384-10907404, chr16:10907385-10907405, chr16:10907433-10907453, chr16:10907434-10907454, chr16:10907435-10907455, chr16:10907441-10907461, chr16:10907454-10907474, chr16:10907461-10907481, chr16:10907476-10907496, chr16:10907539-10907559, chr16:10907586-10907606, chr16:10907589-10907609, chr16:10907621-10907641, chr16:10907622-10907642, chr16:10907623-10907643, chr16:10907730-10907750, chr16:10907731-10907751, chr16:10907757-10907777, chr16:10907781-10907801, chr16:10907787-10907807, chr16:10907790-10907810, chr16:10907810-10907830, chr16:10907820-10907840, chr16:10907870-10907890, chr16:10907886-10907906, chr16:10907924-10907944, chr16:10907928-10907948, chr16:10907932-10907952, chr16:10907935-10907955, chr16:10907978-10907998, chr16:10907979-10907999, chr16:10908069-10908089, chr16:10908073-10908093, chr16:10908101-10908121, chr16:10909056-10909076, chr16:10909138-10909158, chr16:10910195-10910215, chr16:10910196-10910216, chr16:10915592-10915612, chr16:10915626-10915646, chr16:10916375-10916395, chr16:10916382-10916402, chr16:10916426-10916446, chr16:10916432-10916452, chr16:10918486-10918506, chr16:10918492-10918512, chr16:10918493-10918513, chr16:10922435-10922455, chr16:10922441-10922461, chr16:10922441-10922461, chr16:10922444-10922464, chr16:10922460-10922480, chr16:10923257-10923277 и chr16:10923265-10923285. В некоторых вариантах осуществления генетическая модификация содержит по меньшей мере 5 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат, выбранных из: chr16:10916432-10916452, chr16:10922444-10922464, chr16:10907924-10907944, chr16:10906985-10907005, chr16:10908073-10908093, chr16:10907433-10907453, chr16:10907979-10907999, chr16:10907139-10907159, chr16:10922435-10922455, chr16:10907384-10907404, chr16:10907434-10907454, chr16:10907119-10907139, chr16:10907539-10907559, chr16:10907810-10907830, chr16:10907315-10907335, chr16:10916426-10916446, chr16:10909138-10909158, chr16:10908101-10908121,

chr16:10907790-10907810, chr16:10907787-10907807, chr16:10907454-10907474, chr16:10895702-10895722, chr16:10902729-10902749, chr16:10918492-10918512, chr16:10907932-10907952, chr16:10907623-10907643, chr16:10907461-10907481, chr16:10902723-10902743, chr16:10907622-10907642, chr16:10922441-10922461, chr16:10902662-10902682, chr16:10915626-10915646, chr16:10915592-10915612, chr16:10907385-10907405, chr16:10907030-10907050, chr16:10907935-10907955, chr16:10906853-10906873, chr16:10906757-10906777, chr16:10907730-10907750 и chr16:10895302-10895322. В некоторых вариантах осуществления генетическая модификация включает по меньшей мере 5 нуклеотидов экзона в пределах геномных координат, выбранных из: chr16:10907539-10907559, chr16:10916426-10916446, chr16:10906907-10906927, chr16:10895702-10895722, chr16:10907757-10907777, chr16:10907623-10907643, chr16:10915626-10915646, chr16:10906756-10906776, chr16:10907476-10907496, chr16:10907385-10907405 и chr16:10923265-10923285. В некоторых вариантах осуществления генетическая модификация включает по меньшей мере 5 нуклеотидов экзона в пределах геномных координат, выбранных из: chr16:10906853-10906873, chr16:10922444-10922464, chr16:10907924-10907944, chr16:10907315-10907335, chr16:10916432-10916452, chr16:10907932-10907952, chr16:10915626-10915646, chr16:10907586-10907606, chr16:10916426-10916446, chr16:10907476-10907496, chr16:10907787-10907807, chr16:10907979-10907999, chr16:10906904-10906924 и chr16:10909138-10909158. В некоторых вариантах осуществления генетическая модификация включает по меньшей мере 5 нуклеотидов экзона в пределах геномных координат, выбранных из: chr16:10895702-10895722, chr16:10916432-10916452, chr16:10907623-10907643, chr16:10907932-10907952, chr16:10906985-10907005, chr16:10915626-10915646, chr16:10907539-10907559, chr16:10916426-10916446, chr16:10907476-10907496, chr16:10907119-10907139, chr16:10907979-10907999 и chr16:10909138-10909158. В некоторых вариантах осуществления генетическая модификация включает по меньшей мере 5 нуклеотидов экзона в пределах геномных координат, выбранных из: chr16:10906853-10906873, chr16:10906757-10906777, chr16:10895302-10895322, chr16:10907539-10907559, chr16:10907730-10907750 и chr16:10895702-10895722. В некоторых вариантах осуществления генетическая модификация включает по меньшей мере 5 нуклеотидов экзона в пределах геномных координат, выбранных из: chr16:10906853-10906873, chr16:10922444-10922464, chr16:10916432-10916452. В некоторых вариантах осуществления генетическая модификация включает по меньшей мере 5 нуклеотидов экзона в пределах геномных координат chr16:10906853-10906873. В некоторых вариантах осуществления генетическая модификация включает по меньшей мере 5 нуклеотидов экзона в пределах геномных координат chr16:10922444-10922464. В некоторых вариантах осуществления генетическая модификация включает по меньшей мере 5 нуклеотидов экзона, который пределах геномных координат chr16:10906757-10906777. В некоторых вариантах осуществления генетическая модификация включает по меньшей мере 5

нуклеотидов экзона в пределах геномных координат chr16:10916432-10916452. В некоторых вариантах осуществления генетическая модификация включает по меньшей мере 5 нуклеотидов экзона в пределах геномных координат chr16:10895302-10895322. В некоторых вариантах осуществления генетическая модификация включает по меньшей мере 5 нуклеотидов экзона в пределах геномных координат chr16:10907539-10907559. В некоторых вариантах осуществления генетическая модификация включает по меньшей мере 5 нуклеотидов экзона в пределах геномных координат chr16:10907730-10907750. В некоторых вариантах осуществления генетическая модификация включает по меньшей мере 5 нуклеотидов экзона в пределах геномных координат chr16:10895702-10895722. В некоторых вариантах осуществления генетическая модификация включает по меньшей мере 5 нуклеотидов экзона в пределах геномных координат chr16:10907932-10907952. В некоторых вариантах осуществления генетическая модификация включает по меньшей мере 5 нуклеотидов экзона в пределах геномных координат chr16:10907476-10907496. В некоторых вариантах осуществления генетическая модификация включает по меньшей мере 5 нуклеотидов экзона в пределах геномных координат chr16:10909138-10909158.

[00166] В некоторых вариантах осуществления генетическая модификация включает по меньшей мере 10 последовательных нуклеотидов в пределах геномных координат, выбранных из: chr16:10902662-10902682, chr16:10902723-10902743, chr16:10902729-10902749, chr16:10903747-10903767, chr16:10903824-10903844, chr16:10903848-10903868, chr16:10904761-10904781, chr16:10904764-10904784, chr16:10904765-10904785, chr16:10904785-10904805, chr16:10906542-10906562, chr16:10906556-10906576, chr16:10906609-10906629, chr16:10906610-10906630, chr16:10906616-10906636, chr16:10906682-10906702, chr16:10906756-10906776, chr16:10906757-10906777, chr16:10906821-10906841, chr16:10906823-10906843, chr16:10906847-10906867, chr16:10906848-10906868, chr16:10906853-10906873, chr16:10906853-10906873, chr16:10906904-10906924, chr16:10906907-10906927, chr16:10906913-10906933, chr16:10906968-10906988, chr16:10906970-10906990, chr16:10906985-10907005, chr16:10907030-10907050, chr16:10907058-10907078, chr16:10907119-10907139, chr16:10907139-10907159, chr16:10907172-10907192, chr16:10907272-10907292, chr16:10907288-10907308, chr16:10907314-10907334, chr16:10907315-10907335, chr16:10907325-10907345, chr16:10907363-10907383, chr16:10907384-10907404, chr16:10907385-10907405, chr16:10907433-10907453, chr16:10907434-10907454, chr16:10907435-10907455, chr16:10907441-10907461, chr16:10907454-10907474, chr16:10907461-10907481, chr16:10907476-10907496, chr16:10907539-10907559, chr16:10907586-10907606, chr16:10907589-10907609, chr16:10907621-10907641, chr16:10907622-10907642, chr16:10907623-10907643, chr16:10907730-10907750, chr16:10907731-10907751, chr16:10907757-10907777, chr16:10907781-10907801, chr16:10907787-10907807, chr16:10907790-10907810, chr16:10907810-10907830, chr16:10907820-10907840, chr16:10907870-10907890, chr16:10907886-10907906, chr16:10907924-10907944, chr16:10907928-10907948,

chr16:10907932-10907952, chr16:10907935-10907955, chr16:10907978-10907998, chr16:10907979-10907999, chr16:10908069-10908089, chr16:10908073-10908093, chr16:10908101-10908121, chr16:10909056-10909076, chr16:10909138-10909158, chr16:10910195-10910215, chr16:10910196-10910216, chr16:10915592-10915612, chr16:10915626-10915646, chr16:10916375-10916395, chr16:10916382-10916402, chr16:10916426-10916446, chr16:10916432-10916452, chr16:10918486-10918506, chr16:10918492-10918512, chr16:10918493-10918513, chr16:10922435-10922455, chr16:10922441-10922461, chr16:10922441-10922461, chr16:10922444-10922464, chr16:10922460-10922480, chr16:10923257-10923277 и chr16:10923265-10923285. В некоторых вариантах осуществления генетическая модификация содержит по меньшей мере 10 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат, выбранных из: chr16:10916432-10916452, chr16:10922444-10922464, chr16:10907924-10907944, chr16:10906985-10907005, chr16:10908073-10908093, chr16:10907433-10907453, chr16:10907979-10907999, chr16:10907139-10907159, chr16:10922435-10922455, chr16:10907384-10907404, chr16:10907434-10907454, chr16:10907119-10907139, chr16:10907539-10907559, chr16:10907810-10907830, chr16:10907315-10907335, chr16:10916426-10916446, chr16:10909138-10909158, chr16:10908101-10908121, chr16:10907790-10907810, chr16:10907787-10907807, chr16:10907454-10907474, chr16:10895702-10895722, chr16:10902729-10902749, chr16:10918492-10918512, chr16:10907932-10907952, chr16:10907623-10907643, chr16:10907461-10907481, chr16:10902723-10902743, chr16:10907622-10907642, chr16:10922441-10922461, chr16:10902662-10902682, chr16:10915626-10915646, chr16:10915592-10915612, chr16:10907385-10907405, chr16:10907030-10907050, chr16:10907935-10907955, chr16:10906853-10906873, chr16:10906757-10906777, chr16:10907730-10907750 и chr16:10895302-10895322. В некоторых вариантах осуществления генетическая модификация включает по меньшей мере 10 нуклеотидов экзона в пределах геномных координат, выбранных из: chr16:10907539-10907559, chr16:10916426-10916446, chr16:10906907-10906927, chr16:10895702-10895722, chr16:10907757-10907777, chr16:10907623-10907643, chr16:10915626-10915646, chr16:10906756-10906776, chr16:10907476-10907496, chr16:10907385-10907405 и chr16:10923265-10923285. В некоторых вариантах осуществления генетическая модификация включает по меньшей мере 10 нуклеотидов экзона в пределах геномных координат, выбранных из: chr16:10906853-10906873, chr16:10922444-10922464, chr16:10907924-10907944, chr16:10907315-10907335, chr16:10916432-10916452, chr16:10907932-10907952, chr16:10915626-10915646, chr16:10907586-10907606, chr16:10916426-10916446, chr16:10907476-10907496, chr16:10907787-10907807, chr16:10907979-10907999, chr16:10906904-10906924 и chr16:10909138-10909158. В некоторых вариантах осуществления генетическая модификация включает по меньшей мере 10 нуклеотидов экзона в пределах геномных координат, выбранных из: chr16:10895702-10895722, chr16:10916432-10916452, chr16:10907623-10907643, chr16:10907932-10907952,

chr16:10906985-10907005, chr16:10915626-10915646, chr16:10907539-10907559, chr16:10916426-10916446, chr16:10907476-10907496, chr16:10907119-10907139, chr16:10907979-10907999 и chr16:10909138-10909158. В некоторых вариантах осуществления генетическая модификация включает по меньшей мере 10 нуклеотидов экзона в пределах геномных координат, выбранных из: chr16:10906853-10906873, chr16:10906757-10906777, chr16:10895302-10895322, chr16:10907539-10907559, chr16:10907730-10907750 и chr16:10895702-10895722. В некоторых вариантах осуществления генетическая модификация включает по меньшей мере 10 нуклеотидов экзона в пределах геномных координат, выбранных из: chr16:10906853-10906873, chr16:10922444-10922464 и chr16:10916432-10916452. В некоторых вариантах осуществления генетическая модификация включает по меньшей мере 10 нуклеотидов экзона в пределах геномных координат chr16:10906853-10906873. В некоторых вариантах осуществления генетическая модификация включает по меньшей мере 10 нуклеотидов экзона в пределах геномных координат chr16:10922444-10922464. В некоторых вариантах осуществления генетическая модификация включает по меньшей мере 10 нуклеотидов экзона, который пределах геномных координат chr16:10906757-10906777. В некоторых вариантах осуществления генетическая модификация включает по меньшей мере 10 нуклеотидов экзона в пределах геномных координат chr16:10916432-10916452. В некоторых вариантах осуществления генетическая модификация включает по меньшей мере 10 нуклеотидов экзона в пределах геномных координат chr16:10895302-10895322. В некоторых вариантах осуществления генетическая модификация включает по меньшей мере 10 нуклеотидов экзона в пределах геномных координат chr16:10907539-10907559. В некоторых вариантах осуществления генетическая модификация включает по меньшей мере 10 нуклеотидов экзона в пределах геномных координат chr16:10907730-10907750. В некоторых вариантах осуществления генетическая модификация включает по меньшей мере 10 нуклеотидов экзона в пределах геномных координат chr16:10895702-10895722. В некоторых вариантах осуществления генетическая модификация включает по меньшей мере 10 нуклеотидов экзона в пределах геномных координат chr16:10907932-10907952. В некоторых вариантах осуществления генетическая модификация включает по меньшей мере 10 нуклеотидов экзона в пределах геномных координат chr16:10907476-10907496. В некоторых вариантах осуществления генетическая модификация включает по меньшей мере 10 нуклеотидов экзона в пределах геномных координат chr16:10909138-10909158.

[00167] В некоторых вариантах осуществления генетическая модификация включает по меньшей мере одну замену C на T или по меньшей мере одну замену A на G в геномных координатах, выбранных из: chr16:10902662-10902682, chr16:10902723-10902743, chr16:10902729-10902749, chr16:10903747-10903767, chr16:10903824-10903844, chr16:10903848-10903868, chr16:10904761-10904781, chr16:10904764-10904784, chr16:10904765-10904785, chr16:10904785-10904805, chr16:10906542-10906562, chr16:10906556-10906576, chr16:10906609-10906629, chr16:10906610-10906630, chr16:10906616-10906636, chr16:10906682-10906702, chr16:10906756-10906776,

chr16:10906757-10906777, chr16:10906821-10906841, chr16:10906823-10906843, chr16:10906847-10906867, chr16:10906848-10906868, chr16:10906853-10906873, chr16:10906853-10906873, chr16:10906904-10906924, chr16:10906907-10906927, chr16:10906913-10906933, chr16:10906968-10906988, chr16:10906970-10906990, chr16:10906985-10907005, chr16:10907030-10907050, chr16:10907058-10907078, chr16:10907119-10907139, chr16:10907139-10907159, chr16:10907172-10907192, chr16:10907272-10907292, chr16:10907288-10907308, chr16:10907314-10907334, chr16:10907315-10907335, chr16:10907325-10907345, chr16:10907363-10907383, chr16:10907384-10907404, chr16:10907385-10907405, chr16:10907433-10907453, chr16:10907434-10907454, chr16:10907435-10907455, chr16:10907441-10907461, chr16:10907454-10907474, chr16:10907461-10907481, chr16:10907476-10907496, chr16:10907539-10907559, chr16:10907586-10907606, chr16:10907589-10907609, chr16:10907621-10907641, chr16:10907622-10907642, chr16:10907623-10907643, chr16:10907730-10907750, chr16:10907731-10907751, chr16:10907757-10907777, chr16:10907781-10907801, chr16:10907787-10907807, chr16:10907790-10907810, chr16:10907810-10907830, chr16:10907820-10907840, chr16:10907870-10907890, chr16:10907886-10907906, chr16:10907924-10907944, chr16:10907928-10907948, chr16:10907932-10907952, chr16:10907935-10907955, chr16:10907978-10907998, chr16:10907979-10907999, chr16:10908069-10908089, chr16:10908073-10908093, chr16:10908101-10908121, chr16:10909056-10909076, chr16:10909138-10909158, chr16:10910195-10910215, chr16:10910196-10910216, chr16:10915592-10915612, chr16:10915626-10915646, chr16:10916375-10916395, chr16:10916382-10916402, chr16:10916426-10916446, chr16:10916432-10916452, chr16:10918486-10918506, chr16:10918492-10918512, chr16:10918493-10918513, chr16:10922435-10922455, chr16:10922441-10922461, chr16:10922441-10922461, chr16:10922444-10922464, chr16:10922460-10922480, chr16:10923257-10923277 и chr16:10923265-10923285. В некоторых вариантах осуществления генетическая модификация включает по меньшей мере одну замену C на T или по меньшей мере одну замену A на G в геномных координатах, выбранных из: chr16:10916432-10916452, chr16:10922444-10922464, chr16:10907924-10907944, chr16:10906985-10907005, chr16:10908073-10908093, chr16:10907433-10907453, chr16:10907979-10907999, chr16:10907139-10907159, chr16:10922435-10922455, chr16:10907384-10907404, chr16:10907434-10907454, chr16:10907119-10907139, chr16:10907539-10907559, chr16:10907810-10907830, chr16:10907315-10907335, chr16:10916426-10916446, chr16:10909138-10909158, chr16:10908101-10908121, chr16:10907790-10907810, chr16:10907787-10907807, chr16:10907454-10907474, chr16:10895702-10895722, chr16:10902729-10902749, chr16:10918492-10918512, chr16:10907932-10907952, chr16:10907623-10907643, chr16:10907461-10907481, chr16:10902723-10902743, chr16:10907622-10907642, chr16:10922441-10922461, chr16:10902662-10902682, chr16:10915626-10915646, chr16:10915592-10915612, chr16:10907385-10907405, chr16:10907030-10907050,

chr16:10907935-10907955, chr16:10906853-10906873, chr16:10906757-10906777, chr16:10907730-10907750 и chr16:10895302-10895322. В некоторых вариантах осуществления генетическая модификация включает по меньшей мере одну замену C на T или по меньшей мере одну замену A на G в пределах геномных координат, выбранных из: chr16:10907539-10907559, chr16:10916426-10916446, chr16:10906907-10906927, chr16:10895702-10895722, chr16:10907757-10907777, chr16:10907623-10907643, chr16:10915626-10915646, chr16:10906756-10906776, chr16:10907476-10907496, chr16:10907385-10907405 и chr16:10923265-10923285. В некоторых вариантах осуществления генетическая модификация включает по меньшей мере одну замену C на T или по меньшей мере одну замену A на G в пределах геномных координат, выбранных из: chr16:10906853-10906873, chr16:10922444-10922464, chr16:10907924-10907944, chr16:10907315-10907335, chr16:10916432-10916452, chr16:10907932-10907952, chr16:10915626-10915646, chr16:10907586-10907606, chr16:10916426-10916446, chr16:10907476-10907496, chr16:10907787-10907807, chr16:10907979-10907999, chr16:10906904-10906924 и chr16:10909138-10909158. В некоторых вариантах осуществления генетическая модификация включает по меньшей мере одну замену C на T или по меньшей мере одну замену A на G в пределах геномных координат, выбранных из: chr16:10895702-10895722, chr16:10916432-10916452, chr16:10907623-10907643, chr16:10907932-10907952, chr16:10906985-10907005, chr16:10915626-10915646, chr16:10907539-10907559, chr16:10916426-10916446, chr16:10907476-10907496, chr16:10907119-10907139, chr16:10907979-10907999 и chr16:10909138-10909158. В некоторых вариантах осуществления генетическая модификация включает по меньшей мере одну замену C на T или по меньшей мере одну замену A на G в геномных координатах, выбранных из: chr16:10906853-10906873, chr16:10906757-10906777, chr16:10895302-10895322, chr16:10907539-10907559, chr16:10907730-10907750 и chr16:10895702-10895722. В некоторых вариантах осуществления генетическая модификация включает по меньшей мере одну замену C на T или по меньшей мере одну замену A на G в геномных координатах, выбранных из: chr16:10906853-10906873, chr16:10922444-10922464, chr16:10916432-10916452. В некоторых вариантах осуществления генетическая модификация включает по меньшей мере одну замену C на T или по меньшей мере одну замену A на G в пределах геномных координат chr16:10906853-10906873. В некоторых вариантах осуществления генетическая модификация включает по меньшей мере одну замену C на T или по меньшей мере одну замену A на G в пределах геномных координат chr16:10922444-10922464. В некоторых вариантах осуществления генетическая модификация включает по меньшей мере одну замену C на T или по меньшей мере одну замену A на G в пределах геномных координат chr16:10906757-10906777. В некоторых вариантах осуществления генетическая модификация включает по меньшей мере одну замену C на T или по меньшей мере одну замену A на G в пределах геномных координат chr16:10916432-10916452. В некоторых вариантах осуществления генетическая модификация включает по меньшей мере одну

замену C на T или по меньшей мере одну замену A на G в пределах геномных координат chr16:10895302-10895322. В некоторых вариантах осуществления генетическая модификация включает по меньшей мере одну замену C на T или по меньшей мере одну замену A на G в пределах геномных координат chr16:10907539-10907559. В некоторых вариантах осуществления генетическая модификация включает по меньшей мере одну замену C на T или по меньшей мере одну замену A на G в пределах геномных координат chr16:10907730-10907750. В некоторых вариантах осуществления генетическая модификация включает по меньшей мере одну замену C на T или по меньшей мере одну замену A на G в пределах геномных координат chr16:10895702-10895722. В некоторых вариантах осуществления генетическая модификация включает по меньшей мере одну замену C на T или по меньшей мере одну замену A на G в пределах геномных координат chr16:10907932-10907952. В некоторых вариантах осуществления генетическая модификация включает по меньшей мере одну замену C на T или по меньшей мере одну замену A на G в пределах геномных координат chr16:10907476-10907496. В некоторых вариантах осуществления генетическая модификация включает по меньшей мере одну замену C на T или по меньшей мере одну замену A на G в пределах геномных координат chr16:10909138-10909158.

[00168] В некоторых вариантах осуществления модификация CIITA включает любую одну или несколько из вставок, делеций, замен или дезаминирования по меньшей мере одного нуклеотида в целевой последовательности. В некоторых вариантах осуществления модификация CIITA включает вставку 1, 2, 3, 4 или 5 или более нуклеотидов в целевой последовательности. В некоторых вариантах осуществления модификация CIITA включает делецию 1, 2, 3, 4 или 5 или более нуклеотидов в целевой последовательности. В других вариантах осуществления модификация CIITA включает вставку 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20 или 25 или более нуклеотидов в целевой последовательности. В других вариантах осуществления модификация CIITA включает делецию 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20 или 25 или более нуклеотидов в целевой последовательности. В некоторых вариантах осуществления модификация CIITA содержит индел, который обычно определяется в данной области техники как вставка или делеция менее чем 1000 пар нуклеотидов (п.н.). В некоторых вариантах осуществления модификация CIITA содержит индел, который приводит к мутации со сдвигом рамки считывания в целевой последовательности. В некоторых вариантах осуществления модификация CIITA включает замену 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20 или 25 или более нуклеотидов в целевой последовательности. В некоторых вариантах осуществления модификация CIITA включает одну или несколько вставок, делеций или замен нуклеотидов в результате включения матричной нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления модификация CIITA включает вставку донорной нуклеиновой кислоты в целевую последовательность. В некоторых вариантах осуществления модификация CIITA не является временной.

[00169] В некоторых вариантах осуществления генетическая модификация CIITA

приводит к использованию стоп-кодона вне рамки считывания. В некоторых вариантах осуществления генетическая модификация CIITA приводит к снижению экспрессии белка CIITA клеткой. В некоторых вариантах осуществления генетическая модификация CIITA приводит к снижению CIITA в ядре клетки. В некоторых вариантах осуществления модификация CIITA приводит к снижению экспрессии белка MHC класса II на поверхности клетки.

[00170] В некоторых вариантах осуществления генетическая модификация CIITA приводит к усеченной форме белка CIITA. В некоторых вариантах осуществления усеченный белок CIITA не связывается с GTP. В некоторых вариантах осуществления усеченный белок CIITA не локализуется в ядре. В некоторых вариантах осуществления белок CIITA (*например*, усеченная форма белка CIITA) имеет нарушенную активность по сравнению с активностью белка CIITA дикого типа в отношении регуляции экспрессии MHC класса II. В некоторых вариантах осуществления экспрессия MHC класса II на поверхности клетки снижена в результате нарушения активности белка CIITA. В некоторых вариантах осуществления экспрессия MHC класса II на поверхности клетки отсутствует в результате нарушения активности белка CIITA.

3. Эффективность CIITA-направленных РНК

[00171] Эффективность CIITA-направленных РНК можно определить с помощью методов, доступных в данной области техники, которые оценивают эффективность редактирования направляющей РНК, уровни белка CIITA и/или мРНК, и/или уровни MHC класса II в целевой клетке.

[00172] В некоторых вариантах осуществления эффективность CIITA-направленной РНК определяют путем измерения уровней белка CIITA в клетке. Уровни белка CIITA можно определить, *например*, с помощью клеточного лизата и вестерн-блоттинга с антителом к CIITA. В некоторых вариантах осуществления эффективность CIITA-направленной РНК определяют путем измерения уровней белка CIITA в ядре клетки. В некоторых вариантах осуществления эффективность CIITA-направленной РНК определяют путем измерения уровней мРНК CIITA в клетке. Уровни мРНК CIITA можно определить, *например*, с помощью ОТ-ПЦР. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения снижение уровней белка CIITA и/или мРНК CIITA в клетке-мишени по сравнению с немодифицированной клеткой свидетельствует об эффективной РНК-направляемой CIITA.

[00173] «Немодифицированная клетка» (или «немодифицированные клетки») относится к контрольной клетке (или клеткам) того же типа клеток в эксперименте или тесте, где «немодифицированная» контрольная клетка не контактировала с CIITA-направленной РНК. Следовательно, немодифицированная клетка (или клетки) может быть клеткой, которая не контактировала с направляющей РНК, или клеткой, которая контактировала с направляющей РНК, которая не нацелена на CIITA.

[00174] В некоторых вариантах осуществления эффективность CIITA-направленной РНК определяют путем измерения снижения или устранения экспрессии

белка MHC класса II целевыми клетками. Белок CIITA действует как трансактиватор, активируя промотор MHC класса II, и необходим для экспрессии белка MHC класса II. В некоторых вариантах осуществления экспрессия белка MHC класса II может быть обнаружена на поверхности целевых клеток. В некоторых вариантах осуществления экспрессию белка MHC класса II измеряют с помощью проточной цитометрии. В некоторых вариантах осуществления можно использовать антитело к белку MHC класса II (*например*, к HLA-DR, DQ, DP) для обнаружения экспрессии белка MHC класса II, *например*, с помощью проточной цитометрии. В некоторых вариантах осуществления можно использовать одном или более антител к белку MHC класса II (*например*, к HLA-DR, DQ, DP) для обнаружения экспрессии белка MHC класса II, *например*, с помощью проточной цитометрии. В некоторых вариантах осуществления одно или более антител к белку MHC класса II включают одно или более антител к HLA-DR, антитело к HLA-DQ и антитело к HLA-DP. В некоторых вариантах осуществления одно или более антител к белку MHC класса II включают антитело к HLA-DR, антитело к HLA-DQ и антитело к HLA-DP. В некоторых вариантах осуществления одно или более антител к белку MHC класса II включают антитело к HLA-DR, HLA-DQ и HLA-DP.

[00175] В некоторых вариантах осуществления снижение или устранение белка MHC класса II на поверхности клетки (или популяции клеток) по сравнению с немодифицированной клеткой (или популяцией немодифицированных клеток) свидетельствует об эффективной CIITA-направленной РНК. В некоторых вариантах осуществления клетка (или популяция клеток), контактировавшая с конкретной CIITA-направленной РНК и РНК-направляемым ДНК-связывающим агентом, которая является отрицательной в отношении белка MHC класса II по данным проточной цитометрии, свидетельствует об эффективной CIITA-направленной РНК.

[00176] В некоторых вариантах осуществления экспрессия белка MHC класса II снижается или устраняется в популяции клеток с применением описанных в данном документе способов и композиций. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения популяция клеток обогащена (например, с помощью FACS или MACS) и по меньшей мере на 65%, 70%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93% или 94% является отрицательной по MHC класса II по данным проточной цитометрии относительно популяции немодифицированных клеток. В некоторых вариантах осуществления популяция клеток не обогащена (например, с помощью FACS или MACS) и по меньшей мере на 65%, 70%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93% или 94% является отрицательной по MHC класса II по данным проточной цитометрии относительно популяции немодифицированных клеток.

[00177] В некоторых вариантах осуществления популяция клеток по меньшей мере на 65% является отрицательной по MHC класса II, как измерено с помощью проточной цитометрии, относительно популяции немодифицированных клеток. В некоторых вариантах осуществления популяция клеток по меньшей мере на 70% является отрицательной по MHC класса II, как измерено с помощью проточной цитометрии, относительно популяции немодифицированных клеток. В некоторых вариантах

осуществления популяция клеток по меньшей мере на 80% является отрицательной по MHC класса II, как измерено с помощью проточной цитометрии, относительно популяции немодифицированных клеток. В некоторых вариантах осуществления популяция клеток по меньшей мере на 90% является отрицательной по MHC класса II, как измерено с помощью проточной цитометрии, относительно популяции немодифицированных клеток. В некоторых вариантах осуществления популяция клеток по меньшей мере на 91% является отрицательной по MHC класса II, как измерено с помощью проточной цитометрии, относительно популяции немодифицированных клеток. В некоторых вариантах осуществления популяция клеток по меньшей мере на 92% является отрицательной по MHC класса II, как измерено с помощью проточной цитометрии, относительно популяции немодифицированных клеток. В некоторых вариантах осуществления популяция клеток по меньшей мере на 93% является отрицательной по MHC класса II, как измерено с помощью проточной цитометрии, относительно популяции немодифицированных клеток. В некоторых вариантах осуществления популяция клеток по меньшей мере на 94% является отрицательной по MHC класса II, как измерено с помощью проточной цитометрии, относительно популяции немодифицированных клеток. В некоторых вариантах осуществления популяция клеток по меньшей мере на 95% является отрицательной по MHC класса II, как измерено с помощью проточной цитометрии, относительно популяции немодифицированных клеток. В некоторых вариантах осуществления популяция клеток по меньшей мере на 96% является отрицательной по MHC класса II, как измерено с помощью проточной цитометрии, относительно популяции немодифицированных клеток. В некоторых вариантах осуществления популяция клеток по меньшей мере на 97% является отрицательной по MHC класса II, как измерено с помощью проточной цитометрии, относительно популяции немодифицированных клеток. В некоторых вариантах осуществления популяция клеток по меньшей мере на 98% является отрицательной по MHC класса II, как измерено с помощью проточной цитометрии, относительно популяции немодифицированных клеток. В некоторых вариантах осуществления популяция клеток по меньшей мере на 99% является отрицательной по MHC класса II, как измерено с помощью проточной цитометрии, относительно популяции немодифицированных клеток.

[00178] В некоторых вариантах осуществления популяция клеток по меньшей мере на 65% является отрицательной по MHC класса II, как измерено с помощью проточной цитометрии относительно популяции немодифицированных клеток с использованием одного или более антитела к HLA-DR, антитела к HLA-DQ и антитела к HLA-DP. В некоторых вариантах осуществления популяция клеток по меньшей мере на 65% является отрицательной по MHC класса II, как измерено с помощью проточной цитометрии относительно популяции немодифицированных клеток с использованием антитела к HLA-DR, антитела к HLA-DQ и антитела к HLA-DP. В некоторых вариантах осуществления популяция клеток по меньшей мере на 65% является отрицательной по MHC класса II, что определяется с помощью проточной цитометрии относительно популяции

немодифицированных клеток с использованием антител к HLA-DR, HLA-DQ и HLA-DP. В некоторых вариантах осуществления популяция клеток по меньшей мере на 70% является отрицательной по MHC класса II, как измерено с помощью проточной цитометрии относительно популяции немодифицированных клеток с использованием одного или более антитела к HLA-DR, антитела к HLA-DQ и антитела к HLA-DP. В некоторых вариантах осуществления популяция клеток по меньшей мере на 70% является отрицательной по MHC класса II, как измерено с помощью проточной цитометрии относительно популяции немодифицированных клеток с использованием антитела к HLA-DR, антитела к HLA-DQ и антитела к HLA-DP. В некоторых вариантах осуществления популяция клеток по меньшей мере на 70% является отрицательной по MHC класса II, что определяется с помощью проточной цитометрии относительно популяции немодифицированных клеток с использованием антител к HLA-DR, HLA-DQ и HLA-DP. В некоторых вариантах осуществления популяция клеток по меньшей мере на 80% является отрицательной по MHC класса II, как измерено с помощью проточной цитометрии относительно популяции немодифицированных клеток с использованием одного или более антитела к HLA-DR, антитела к HLA-DQ и антитела к HLA-DP. В некоторых вариантах осуществления популяция клеток по меньшей мере на 80% является отрицательной по MHC класса II, как измерено с помощью проточной цитометрии относительно популяции немодифицированных клеток с использованием антитела к HLA-DR, антитела к HLA-DQ и антитела к HLA-DP. В некоторых вариантах осуществления популяция клеток по меньшей мере на 80% является отрицательной по MHC класса II, что определяется с помощью проточной цитометрии относительно популяции немодифицированных клеток с использованием антител к HLA-DR, HLA-DQ и HLA-DP. В некоторых вариантах осуществления популяция клеток по меньшей мере на 90% является отрицательной по MHC класса II, как измерено с помощью проточной цитометрии относительно популяции немодифицированных клеток с использованием одного или более антитела к HLA-DR, антитела к HLA-DQ и антитела к HLA-DP. В некоторых вариантах осуществления популяция клеток по меньшей мере на 90% является отрицательной по MHC класса II, как измерено с помощью проточной цитометрии относительно популяции немодифицированных клеток с использованием антитела к HLA-DR, антитела к HLA-DQ и антитела к HLA-DP. В некоторых вариантах осуществления популяция клеток по меньшей мере на 90% является отрицательной по MHC класса II, что определяется с помощью проточной цитометрии относительно популяции немодифицированных клеток с использованием антител к HLA-DR, HLA-DQ и HLA-DP. В некоторых вариантах осуществления популяция клеток по меньшей мере на 92% является отрицательной по MHC класса II, как измерено с помощью проточной цитометрии относительно популяции немодифицированных клеток с использованием одного или более антитела к HLA-DR, антитела к HLA-DQ и антитела к HLA-DP. В некоторых вариантах осуществления популяция клеток по меньшей мере на 92% является отрицательной по MHC класса II, как измерено с помощью проточной цитометрии

относительно популяции немодифицированных клеток с использованием антитела к HLA-DR, антитела к HLA-DQ и антитела к HLA-DP. В некоторых вариантах осуществления популяция клеток по меньшей мере на 92% является отрицательной по MHC класса II, что определяется с помощью проточной цитометрии относительно популяции немодифицированных клеток с использованием антител к HLA-DR, HLA-DQ и HLA-DP. В некоторых вариантах осуществления популяция клеток по меньшей мере на 93% является отрицательной по MHC класса II, как измерено с помощью проточной цитометрии относительно популяции немодифицированных клеток с использованием одного или более антитела к HLA-DR, антитела к HLA-DQ и антитела к HLA-DP. В некоторых вариантах осуществления популяция клеток по меньшей мере на 93% является отрицательной по MHC класса II, как измерено с помощью проточной цитометрии относительно популяции немодифицированных клеток с использованием антитела к HLA-DR, антитела к HLA-DQ и антитела к HLA-DP. В некоторых вариантах осуществления популяция клеток по меньшей мере на 93% является отрицательной по MHC класса II, что определяется с помощью проточной цитометрии относительно популяции немодифицированных клеток с использованием антител к HLA-DR, HLA-DQ и HLA-DP. В некоторых вариантах осуществления популяция клеток по меньшей мере на 94% является отрицательной по MHC класса II, как измерено с помощью проточной цитометрии относительно популяции немодифицированных клеток с использованием одного или более антитела к HLA-DR, антитела к HLA-DQ и антитела к HLA-DP. В некоторых вариантах осуществления популяция клеток по меньшей мере на 94% является отрицательной по MHC класса II, как измерено с помощью проточной цитометрии относительно популяции немодифицированных клеток с использованием антитела к HLA-DR, антитела к HLA-DQ и антитела к HLA-DP. В некоторых вариантах осуществления популяция клеток по меньшей мере на 94% является отрицательной по MHC класса II, что определяется с помощью проточной цитометрии относительно популяции немодифицированных клеток с использованием антител к HLA-DR, HLA-DQ и HLA-DP. В некоторых вариантах осуществления популяция клеток по меньшей мере на 95% является отрицательной по MHC класса II, как измерено с помощью проточной цитометрии относительно популяции немодифицированных клеток с использованием одного или более антитела к HLA-DR, антитела к HLA-DQ и антитела к HLA-DP. В некоторых вариантах осуществления популяция клеток по меньшей мере на 95% является отрицательной по MHC класса II, как измерено с помощью проточной цитометрии относительно популяции немодифицированных клеток с использованием антитела к HLA-DR, антитела к HLA-DQ и антитела к HLA-DP. В некоторых вариантах осуществления популяция клеток по меньшей мере на 95% является отрицательной по MHC класса II, что определяется с помощью проточной цитометрии относительно популяции немодифицированных клеток с использованием антител к HLA-DR, HLA-DQ и HLA-DP. В некоторых вариантах осуществления популяция клеток по меньшей мере на 96% является отрицательной по MHC класса II, как измерено с помощью проточной

цитометрии относительно популяции немодифицированных клеток с использованием одного или более антитела к HLA-DR, антитела к HLA-DQ и антитела к HLA-DP. В некоторых вариантах осуществления популяция клеток по меньшей мере на 96% является отрицательной по MHC класса II, как измерено с помощью проточной цитометрии относительно популяции немодифицированных клеток с использованием антитела к HLA-DR, антитела к HLA-DQ и антитела к HLA-DP. В некоторых вариантах осуществления популяция клеток по меньшей мере на 96% является отрицательной по MHC класса II, что определяется с помощью проточной цитометрии относительно популяции немодифицированных клеток с использованием антител к HLA-DR, HLA-DQ и HLA-DP. В некоторых вариантах осуществления популяция клеток по меньшей мере на 97% является отрицательной по MHC класса II, как измерено с помощью проточной цитометрии относительно популяции немодифицированных клеток с использованием одного или более антитела к HLA-DR, антитела к HLA-DQ и антитела к HLA-DP. В некоторых вариантах осуществления популяция клеток по меньшей мере на 97% является отрицательной по MHC класса II, как измерено с помощью проточной цитометрии относительно популяции немодифицированных клеток с использованием антитела к HLA-DR, антитела к HLA-DQ и антитела к HLA-DP. В некоторых вариантах осуществления популяция клеток по меньшей мере на 97% является отрицательной по MHC класса II, что определяется с помощью проточной цитометрии относительно популяции немодифицированных клеток с использованием антител к HLA-DR, HLA-DQ и HLA-DP. В некоторых вариантах осуществления популяция клеток по меньшей мере на 98% является отрицательной по MHC класса II, как измерено с помощью проточной цитометрии относительно популяции немодифицированных клеток с использованием одного или более антитела к HLA-DR, антитела к HLA-DQ и антитела к HLA-DP. В некоторых вариантах осуществления популяция клеток по меньшей мере на 98% является отрицательной по MHC класса II, как измерено с помощью проточной цитометрии относительно популяции немодифицированных клеток с использованием антитела к HLA-DR, антитела к HLA-DQ и антитела к HLA-DP. В некоторых вариантах осуществления популяция клеток по меньшей мере на 98% является отрицательной по MHC класса II, что определяется с помощью проточной цитометрии относительно популяции немодифицированных клеток с использованием антител к HLA-DR, HLA-DQ и HLA-DP. В некоторых вариантах осуществления популяция клеток по меньшей мере на 99% является отрицательной по MHC класса II, как измерено с помощью проточной цитометрии относительно популяции немодифицированных клеток с использованием одного или более антитела к HLA-DR, антитела к HLA-DQ и антитела к HLA-DP. В некоторых вариантах осуществления популяция клеток по меньшей мере на 99% является отрицательной по MHC класса II, как измерено с помощью проточной цитометрии относительно популяции немодифицированных клеток с использованием антитела к HLA-DR, антитела к HLA-DQ и антитела к HLA-DP. В некоторых вариантах осуществления популяция клеток по меньшей мере на 99% является отрицательной по MHC класса II, что

определяется с помощью проточной цитометрии относительно популяции немодифицированных клеток с использованием антител к HLA-DR, HLA-DQ и HLA-DP.

[00179] В некоторых вариантах осуществления эффективная CIITA-направленная РНК может быть определена путем измерения ответа иммунных клеток in vitro или in vivo (*например*, CD4+ Т-клеток) на генетически модифицированную целевую клетку. Реакцию CD4+ Т-клеток можно оценить с помощью анализа, который измеряет активационную реакцию CD4+ Т-клеток, *например*, пролиферацию CD4+ Т-клеток, экспрессию маркеров активации и/или продукцию цитокинов (IL-2, IL-12, IFN-γ) (*например*, проточная цитометрия, ИФА). Реакцию CD4+ Т-клеток можно оценить в анализах клеточных культур in vitro, в которых генетически модифицированную клетку культивируют совместно с клетками, содержащими CD4+ Т-клетки. Например, генетически модифицированную клетку можно культивировать совместно, *например*, с PBMC, очищенными CD3+ Т-клетками, содержащими CD4+ Т-клетки, очищенными CD4+ Т-клетками или линией CD4+ Т-клеток. Ответ CD4+ Т-клеток, вызванную генетически модифицированной клеткой, можно сравнить с ответом, вызванным немодифицированной клеткой. Сниженный ответ CD4+ Т-клеток свидетельствует об эффективной CIITA-направленной РНК.

[00180] Эффективность CIITA-направленной РНК можно также оценить по выживаемости клеток после редактирования. В некоторых вариантах осуществления клетка выживает после редактирования в течение по меньшей мере от одной недели до шести недель. В некоторых вариантах осуществления клетка выживает после редактирования в течение по меньшей мере от одной недели до двенадцати недель. В некоторых вариантах осуществления клетка выживает после редактирования в течение по меньшей мере двух недель. В некоторых вариантах осуществления клетка выживает после редактирования в течение по меньшей мере трех недель. В некоторых вариантах осуществления клетка выживает после редактирования в течение по меньшей мере четырех недель. В некоторых вариантах осуществления клетка выживает после редактирования в течение по меньшей мере пяти недель. В некоторых вариантах осуществления клетка выживает после редактирования в течение по меньшей мере шести недель. Жизнеспособность генетически модифицированной клетки можно измерить с применением стандартных методов, включая, *например*, измерение гибели клеток, окрашивание живых/мертвых клеток с помощью проточной цитометрии или пролиферацию клеток.

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

1. Нокаут MHC класса I

[00181] В некоторых вариантах осуществления предложены способы снижения или устранения экспрессии белка MHC класса II на поверхности клетки путем генетической модификации CIITA, как описано в данном документе, при этом способы дополнительно обеспечивают снижение или устранение экспрессии белка MHC класса I на поверхности

клетки по отношению к немодифицированной клетке. В одном подходе экспрессия белка MHC класса I снижается или устраняется путем генетической модификации гена B2M. В некоторых вариантах осуществления экспрессия белка MHC класса I снижается или устраняется путем приведения в контакт клетки с B2M-направленной РНК. В другом подходе экспрессия белка HLA-A MHC класса I снижается или устраняется путем генетической модификации HLA-A, тем самым снижая или устраняя поверхностную экспрессию HLA-A в клетке человека, при этом клетка человека является гомозиготной по HLA-B и гомозиготный по HLA-C. Следовательно, в некоторых вариантах осуществления экспрессия белка HLA-A снижается или устраняется путем приведения в контакт клетки человека с HLA-A-направленной РНК, при этом клетка человека является гомозиготной по HLA-B и гомозиготной по HLA-C. В некоторых вариантах осуществления полученная клетка представляет собой аллогенную клетку.

[00182] В некоторых вариантах осуществления способы включают снижение или устранение поверхностной экспрессии белка MHC класса II в сконструированной клетке по сравнению с немодифицированной клеткой, включая приведение клетки в контакт с композицией, содержащей CIITA-направленную РНК, описанную в данном документе, при этом способ дополнительно включает приведение клетки в контакт с B2M-направленной РНК. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает приведение клетки в контакт с РНК-направляемым ДНК-связывающим агентом. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает индукцию DSB или SSB в целевой последовательности B2M. В некоторых вариантах осуществления в клетке снижена экспрессия B2M. В некоторых вариантах осуществления в клетке снижена или устранена экспрессия белка MHC класса I.

[00183] В некоторых вариантах осуществления B2M-направленная РНК нацелена на ген B2M человека.

[00184] В некоторых вариантах осуществления B2M-направленная РНК содержит SEQ ID NO: 701. В некоторых вариантах осуществления B2M-направленная РНК содержит направляющую последовательность, которая представляет собой по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов SEQ ID NO: 701. В некоторых вариантах осуществления B2M-направленная РНК содержит направляющую последовательность, которая по меньшей мере на 95%, 90% или 85% идентична SEQ ID NO: 701.

[00185] В данном документе предложены дополнительные варианты осуществления B2M-направленных РНК, включая, *например*, иллюстративные модификации направляющей РНК.

[00186] В некоторых вариантах осуществления эффективность B2M-направленной РНК определяют путем измерения уровней белка B2M в клетке по сравнению с немодифицированной клеткой. В некоторых вариантах осуществления эффективность B2M-направленной РНК определяют путем измерения уровней белка B2M, экспрессируемого клеткой. В некоторых вариантах осуществления антитело к белку B2M (*например*, анти-B2M) можно использовать для определения уровня белка B2M, *например*,

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

[00187] В некоторых вариантах осуществления эффективность B2M-направленной РНК определяют путем измерения уровней белка МНС класса I на поверхности клетки. В некоторых вариантах осуществления уровни белка МНС класса I измеряют с помощью проточной цитометрии (*например*, с антителом к HLA-A, HLA-B или HLA-C). В некоторых вариантах осуществления популяция клеток по меньшей мере на 65% является отрицательной по МНС класса I, как измерено с помощью проточной цитометрии, относительно популяции немодифицированных клеток. В некоторых вариантах осуществления популяция клеток является по меньшей мере на 70% отрицательной по МНС I, как измерено с помощью проточной цитометрии, относительно популяции немодифицированных клеток. В некоторых вариантах осуществления популяция клеток является по меньшей мере на 80% отрицательной по МНС I, как измерено с помощью проточной цитометрии, относительно популяции немодифицированных клеток. В некоторых вариантах осуществления популяция клеток является по меньшей мере на 90% отрицательной по МНС I, как измерено с помощью проточной цитометрии, относительно популяции немодифицированных клеток. В некоторых вариантах осуществления популяция клеток является по меньшей мере на 95% отрицательной по МНС I, как измерено с помощью проточной цитометрии, относительно популяции немодифицированных клеток. В некоторых вариантах осуществления популяция клеток по меньшей мере на 100% является отрицательной по МНС класса I, как измерено с помощью проточной цитометрии, относительно популяции немодифицированных клеток.

[00188] В некоторых вариантах осуществления способы включают снижение или устранение поверхностной экспрессии белка МНС класса II в сконструированной клетке по сравнению с немодифицированной клеткой, включая приведение клетки в контакт с композицией, содержащей CIITA-направленную РНК, описанную в данном документе, при этом способ, дополнительно включает снижение или устранение экспрессии HLA-A в клетке с помощью системы редактирования генов, которая связывается с геномной целевой последовательностью HLA-A, содержащей по меньшей мере 5 смежных

нуклеотидов в пределах геномных координат, выбранных из: chr6:29942864-29942884; chr6:29942868-29942888; chr6:29942876-29942896; chr6:29942877-29942897; chr6:29942883-29942903; chr6:29943126-29943146; chr6:29943528-29943548; chr6:29943529-29943549; chr6:29943530-29943550; chr6:29943537-29943557; chr6:29943549-29943569; chr6:29943589-29943609 и chr6:29944026-29944046. В некоторых вариантах осуществления способы включают снижение или устранение поверхностной экспрессии белка MHC класса II в сконструированной клетке по сравнению с немодифицированной клеткой, включая приведение клетки в контакт с композицией, содержащей CIITA-направленную РНК, описанную в данном документе, при этом способ, дополнительно включает снижение или устранение экспрессии HLA-A в клетке с помощью системы редактирования генов, которая связывается с геномной целевой последовательностью HLA-A, содержащей по меньшей мере 10 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат, выбранных из: chr6:29942864-29942884; chr6:29942868-29942888; chr6:29942876-29942896; chr6:29942877-29942897; chr6:29942883-29942903; chr6:29943126-29943146; chr6:29943528-29943548; chr6:29943529-29943549; chr6:29943530-29943550; chr6:29943537-29943557; chr6:29943549-29943569; chr6:29943589-29943609 и chr6:29944026-29944046. В некоторых вариантах осуществления геномные координаты HLA-A выбирают из chr6:29942864-29942884. В некоторых вариантах осуществления геномные координаты HLA-A выбирают из chr6:29942868-29942888. В некоторых вариантах осуществления геномные координаты HLA-A выбирают из chr6:29942876-29942896. В некоторых вариантах осуществления геномные координаты HLA-A выбирают из chr6:29942877-29942897. В некоторых вариантах осуществления геномные координаты HLA-A выбирают из chr6:29942883-29942903. В некоторых вариантах осуществления геномные координаты HLA-A выбирают из chr6:29943126-29943146. В некоторых вариантах осуществления геномные координаты HLA-A выбирают из chr6:29943528-29943548. В некоторых вариантах осуществления геномные координаты HLA-A выбирают из chr6:29943529-29943549. В некоторых вариантах осуществления геномные координаты HLA-A выбирают из chr6:29943530-29943550. В некоторых вариантах осуществления геномные координаты HLA-A выбирают из chr6:29943537-29943557. В некоторых вариантах осуществления геномные координаты HLA-A выбирают из chr6:29943549-29943569. В некоторых вариантах осуществления геномные координаты HLA-A выбирают из chr6:29943589-29943609. В некоторых вариантах осуществления геномные координаты HLA-A выбирают из chr6:29944026-29944046. В некоторых вариантах осуществления система редактирования генов содержит РНК-направляемый ДНК-связывающий агент. В некоторых вариантах осуществления РНК-направляемый ДНК-связывающий агент содержит белок Cas9, такой как Cas9 S. pyogenes. В некоторых вариантах осуществления клетка является гомозиготной по HLA-B и гомозиготной по HLA-C.

[00189] В некоторых вариантах осуществления способы включают снижение или устранение поверхностной экспрессии белка MHC класса II в сконструированной клетке

по сравнению с немодифицированной клеткой, включая приведение клетки в контакт с композицией, содержащей CIITA-направленную РНК, описанную в данном документе, при этом способ дополнительно включает приведение клетки в контакт с HLA-A-направленной РНК. В некоторых вариантах осуществления HLA-A-направленная РНК содержит направляющую последовательность из SEQ ID NO: 2001-2095 (см. **Таблицу 3** ниже). В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает приведение клетки в контакт с РНК-направляемым ДНК-связывающим агентом. В некоторых вариантах осуществления РНК-направляемый ДНК-связывающий агент содержит белок Cas9, такой как Cas9 S. pyogenes. В некоторых вариантах осуществления клетка является гомозиготной по HLA-B и гомозиготной по HLA-C.

[00190] В некоторых вариантах осуществления предложены способы получения сконструированной клетки, в которой снижена или устранена поверхностная экспрессия белка MHC класса II по сравнению с немодифицированной клеткой, включающий: a. приведение клетки в контакт с CIITA-направленной РНК, при этом направляющая РНК содержит направляющую последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1-117; b. и приведение клетки в контакт с HLA-A-направленной РНК, при этом HLA-A-направленная РНК содержит направляющую последовательность, выбранную из любой из SEQ ID NO: 2001-2095 (см. **Таблицу 3** ниже); и c. необязательно, приведение клетки в контакт с ДНК-связывающим агентом, направляемым РНК, или нуклеиновой кислотой, кодирующей ДНК-связывающий агент, направляемый РНК; при этом в клетке снижена или устранена поверхностная экспрессия HLA-A по сравнению с немодифицированной клеткой. В некоторых вариантах осуществления способ включает приведение клетки в контакт с РНК-направляемым ДНК-связывающим агентом или нуклеиновой кислотой, кодирующей РНК-направляемый ДНК-связывающий агент. В некоторых вариантах осуществления РНК-направляемый ДНК-связывающий агент содержит Cas9 S. pyogenes. В некоторых вариантах осуществления клетка является гомозиготной по HLA-B и гомозиготной по HLA-C.

[00191] Примеры направляющих РНК HLA-A представлены в **Таблице 3** (SEQ ID NO: 2001-2095 с соответствующими последовательностями направляющей РНК SEQ ID NO: 427-521 и 603-697).

[00192] **Таблица 3. Иллюстративные направляющие последовательности HLA-A**

ID направляющей	**SEQ ID NO к направляющей последовательности**	**Направляющая последовательность**	**Иллюстративная Полная последовательность (SEQ ID NO: 427-521)**	**Иллюстративная Mod-последовательность** (четыре концевых остатка U являются необязательными и могут включать 0, 1, 2, 3, 4 или большее количество остатков U) **(SEQ ID NO: 603-697)**	**Геномные координаты**
G018983	2001	UGGAGGGC CUGAUGUG UGUU	UGGAGGGC CUGAUGUG UGUUGUUU UAGAGCUA GAAAUAGC AAGUUAAA AUAAGGCU AGUCCGUU AUCAACUU GAAAAAGU GGCACCGA GUCGGUGC UUUU	mU*mG*mG*A GGGCCUGAUG UGUGUUGUUU UAGAmGmCmU mAmGmAmAm AmUmAmGmCA AGUUAAAAUA AGGCUAGUCC GUUAUCAmAm CmUmUmGmA mAmAmAmAm GmUmGmGmC mAmCmCmGmA mGmUmCmGm GmUmGmCmU* mU*mU*mU	chr6:2994529 0-29945310 (несоответствие hg38=2)
G018984	2002	GCCUGAUG UGUGUUGG GUGU	GCCUGAUG UGUGUUGG GUGUGUUU UAGAGCUA GAAAUAGC AAGUUAAA AUAAGGCU	mG*mC*mC*UG AUGUGUGUUG GGUGUGUUUU AGAmGmCmUm AmGmAmAmA mUmAmGmCAA GUUAAAAUAA	chr6:2994529 6-29945316 (несоответствие hg38=2)

			AGUCCGUU AUCAACUU GAAAAAGU GGCACCGA GUCGGUGC UUUU	GGCUAGUCCG UUAUCAmAmC mUmUmGmAm AmAmAmAmG mUmGmGmCm AmCmCmGmAm GmUmCmGmG mUmGmCmU*m U*mU*mU	
G018985	2003	CCUGAUGU GUGUUGGG UGUU	CCUGAUGU GUGUUGGG UGUUGUUU UAGAGCUA GAAAUAGC AAGUUAAA AUAAGGCU AGUCCGUU AUCAACUU GAAAAAGU GGCACCGA GUCGGUGC UUUU	mC*mC*mU*GA UGUGUGUUGG GUGUUGUUUU AGAmGmCmUm AmGmAmAmA mUmAmGmCAA GUUAAAAUAA GGCUAGUCCG UUAUCAmAmC mUmUmGmAm AmAmAmAmG mUmGmGmCm AmCmCmGmAm GmUmCmGmG mUmGmCmU*m U*mU*mU	chr6:2994529 7-29945317 (несоответствие hg38=1)
G018986	2004	CCCAACAC CCAACACA CAUC	CCCAACAC CCAACACA CAUCGUUU UAGAGCUA GAAAUAGC AAGUUAAA AUAAGGCU AGUCCGUU AUCAACUU GAAAAAGU	mC*mC*mC*AA CACCCAACAC ACAUCGUUUU AGAmGmCmUm AmGmAmAmA mUmAmGmCAA GUUAAAAUAA GGCUAGUCCG UUAUCAmAmC mUmUmGmAm	chr6:2994530 0-29945320 (несоответствие hg38=1)

			GGCACCGA GUCGGUGC UUUU	AmAmAmAmG mUmGmGmCm AmCmCmGmAm GmUmCmGmG mUmGmCmU*m U*mU*mU	
G018965	2005	UCAGGAAA CAUGAAGA AAGC	UCAGGAAA CAUGAAGA AAGCGUUU UAGAGCUA GAAAUAGC AAGUUAAA AUAAGGCU AGUCCGUU AUCAACUU GAAAAAGU GGCACCGA GUCGGUGC UUUU	mU*mC*mA*GG AAACAUGAAG AAAGCGUUUU AGAmGmCmUm AmGmAmAmA mUmAmGmCAA GUUAAAAUAA GGCUAGUCCG UUAUCAmAmC mUmUmGmAm AmAmAmAmG mUmGmGmCm AmCmCmGmAm GmUmCmGmG mUmGmCmU*m U*mU*mU	chr6:2989011 7-29890137
G019018	2006	AGGCGCCU GGGCCUCU CCCG	AGGCGCCU GGGCCUCU CCCGGUUU UAGAGCUA GAAAUAGC AAGUUAAA AUAAGGCU AGUCCGUU AUCAACUU GAAAAAGU GGCACCGA GUCGGUGC UUUU	mA*mG*mG*CG CCUGGGCCUC UCCCGGUUUU AGAmGmCmUm AmGmAmAmA mUmAmGmCAA GUUAAAAUAA GGCUAGUCCG UUAUCAmAmC mUmUmGmAm AmAmAmAmG mUmGmGmCm AmCmCmGmAm	chr6:2992705 8-29927078

				GmUmCmGmG mUmGmCmU*m U*mU*mU	
G018937	2007	CGGGCUGG CCUCCCAC AAGG	CGGGCUGG CCUCCCAC AAGGGUUU UAGAGCUA GAAAUAGC AAGUUAAA AUAAGGCU AGUCCGUU AUCAACUU GAAAAAGU GGCACCGA GUCGGUGC UUUU	mC*mG*mG*GC UGGCCUCCCA CAAGGGUUUU AGAmGmCmUm AmGmAmAmA mUmAmGmCAA GUUAAAAUAA GGCUAGUCCG UUAUCAmAmC mUmUmGmAm AmAmAmAmG mUmGmGmCm AmCmCmGmAm GmUmCmGmG mUmGmCmU*m U*mU*mU	chr6:2993433 0-29934350
G018990	2008	ACGGCCAU CCUCGGCG UCUG	ACGGCCAU CCUCGGCG UCUGGUUU UAGAGCUA GAAAUAGC AAGUUAAA AUAAGGCU AGUCCGUU AUCAACUU GAAAAAGU GGCACCGA GUCGGUGC UUUU	mA*mC*mG*GC CAUCCUCGGC GUCUGGUUUU AGAmGmCmUm AmGmAmAmA mUmAmGmCAA GUUAAAAUAA GGCUAGUCCG UUAUCAmAmC mUmUmGmAm AmAmAmAmG mUmGmGmCm AmCmCmGmAm GmUmCmGmG mUmGmCmU*m U*mU*mU	chr6:2994254 1-29942561

G018991	2009	GACGGCCA UCCUCGGC GUCU	GACGGCCA UCCUCGGC GUCUGUUU UAGAGCUA GAAAUAGC AAGUUAAA AUAAGGCU AGUCCGUU AUCAACUU GAAAAAGU GGCACCGA GUCGGUGC UUUU	mG*mA*mC*GG CCAUCCUCGG CGUCUGUUUU AGAmGmCmUm AmGmAmAmA mUmAmGmCAA GUUAAAAUAA GGCUAGUCCG UUAUCAmAmC mUmUmGmAm AmAmAmAmG mUmGmGmCm AmCmCmGmAm GmUmCmGmG mUmGmCmU*m U*mU*mU	chr6:2994254 2-29942562
G018992	2010	GACGCCGA GGAUGGCC GUCA	GACGCCGA GGAUGGCC GUCAGUUU UAGAGCUA GAAAUAGC AAGUUAAA AUAAGGCU AGUCCGUU AUCAACUU GAAAAAGU GGCACCGA GUCGGUGC UUUU	mG*mA*mC*GC CGAGGAUGGC CGUCAGUUUU AGAmGmCmUm AmGmAmAmA mUmAmGmCAA GUUAAAAUAA GGCUAGUCCG UUAUCAmAmC mUmUmGmAm AmAmAmAmG mUmGmGmCm AmCmCmGmAm GmUmCmGmG mUmGmCmU*m U*mU*mU	chr6:2994254 3-29942563
G018993	2011	UGACGGCC AUCCUCGG CGUC	UGACGGCC AUCCUCGG CGUCGUUU	mU*mG*mA*CG GCCAUCCUCG GCGUCGUUUU	chr6:2994254 3-29942563

			UAGAGCUA GAAAUAGC AAGUUAAA AUAAGGCU AGUCCGUU AUCAACUU GAAAAAGU GGCACCGA GUCGGUGC UUUU	AGAmGmCmUm AmGmAmAmA mUmAmGmCAA GUUAAAAUAA GGCUAGUCCG UUAUCAmAmC mUmUmGmAm AmAmAmAmG mUmGmGmCm AmCmCmGmAm GmUmCmGmG mUmGmCmU*m U*mU*mU	
G018994	2012	GGCGCCAU GACGGCCA UCCU	GGCGCCAU GACGGCCA UCCUGUUU UAGAGCUA GAAAUAGC AAGUUAAA AUAAGGCU AGUCCGUU AUCAACUU GAAAAAGU GGCACCGA GUCGGUGC UUUU	mG*mG*mC*GC CAUGACGGCC AUCCUGUUUU AGAmGmCmUm AmGmAmAmA mUmAmGmCAA GUUAAAAUAA GGCUAGUCCG UUAUCAmAmC mUmUmGmAm AmAmAmAmG mUmGmGmCm AmCmCmGmAm GmUmCmGmG mUmGmCmU*m U*mU*mU	chr6:2994255 0-29942570
G018995	2013	ACAGCGAC GCCGCGAG CCAG	ACAGCGAC GCCGCGAG CCAGGUUU UAGAGCUA GAAAUAGC AAGUUAAA	mA*mC*mA*GC GACGCCGCGA GCCAGGUUUU AGAmGmCmUm AmGmAmAmA mUmAmGmCAA	chr6:2994286 4-29942884

			AUAAGGCU AGUCCGUU AUCAACUU GAAAAAGU GGCACCGA GUCGGUGC UUUU	GUUAAAAUAA GGCUAGUCCG UUAUCAmAmC mUmUmGmAm AmAmAmAmG mUmGmGmCm AmCmCmGmAm GmUmCmGmG mUmGmCmU*m U*mU*mU	
G018996	2014	CGACGCCG CGAGCCAG AGGA	CGACGCCG CGAGCCAG AGGAGUUU UAGAGCUA GAAAUAGC AAGUUAAA AUAAGGCU AGUCCGUU AUCAACUU GAAAAAGU GGCACCGA GUCGGUGC UUUU	mC*mG*mA*CG CCGCGAGCCA GAGGAGUUUU AGAmGmCmUm AmGmAmAmA mUmAmGmCAA GUUAAAAUAA GGCUAGUCCG UUAUCAmAmC mUmUmGmAm AmAmAmAmG mUmGmGmCm AmCmCmGmAm GmUmCmGmG mUmGmCmU*m U*mU*mU	chr6:2994286 8-29942888
G018997	2015	CGAGCCAG AGGAUGGA GCCG	CGAGCCAG AGGAUGGA GCCGGUUU UAGAGCUA GAAAUAGC AAGUUAAA AUAAGGCU AGUCCGUU AUCAACUU	mC*mG*mA*GC CAGAGGAUGG AGCCGGUUUU AGAmGmCmUm AmGmAmAmA mUmAmGmCAA GUUAAAAUAA GGCUAGUCCG UUAUCAmAmC	chr6:2994287 6-29942896

			GAAAAAGU GGCACCGA GUCGGUGC UUUU	mUmUmGmAm AmAmAmAmG mUmGmGmCm AmCmCmGmAm GmUmCmGmG mUmGmCmU*m U*mU*mU	
G018998	2016	CGGCUCCA UCCUCUGG CUCG	CGGCUCCA UCCUCUGG CUCGGUUU UAGAGCUA GAAAUAGC AAGUUAAA AUAAGGCU AGUCCGUU AUCAACUU GAAAAAGU GGCACCGA GUCGGUGC UUUU	mC*mG*mG*CU CCAUCCUCUG GCUCGGUUUU AGAmGmCmUm AmGmAmAmA mUmAmGmCAA GUUAAAAUAA GGCUAGUCCG UUAUCAmAmC mUmUmGmAm AmAmAmAmG mUmGmGmCm AmCmCmGmAm GmUmCmGmG mUmGmCmU*m U*mU*mU	chr6:2994287 6-29942896
G018999	2017	GAGCCAGA GGAUGGAG CCGC	GAGCCAGA GGAUGGAG CCGCGUUU UAGAGCUA GAAAUAGC AAGUUAAA AUAAGGCU AGUCCGUU AUCAACUU GAAAAAGU GGCACCGA GUCGGUGC	mG*mA*mG*CC AGAGGAUGGA GCCGCGUUUU AGAmGmCmUm AmGmAmAmA mUmAmGmCAA GUUAAAAUAA GGCUAGUCCG UUAUCAmAmC mUmUmGmAm AmAmAmAmG mUmGmGmCm	chr6:2994287 7-29942897

			UUUU	AmCmCmGmAm GmUmCmGmG mUmGmCmU*m U*mU*mU	
G019000	2018	GCGCCCGC GGCUCCAU CCUC	GCGCCCGC GGCUCCAU CCUCGUUU UAGAGCUA GAAAUAGC AAGUUAAA AUAAGGCU AGUCCGUU AUCAACUU GAAAAAGU GGCACCGA GUCGGUGC UUUU	mG*mC*mG*CC CGCGGCUCCA UCCUCGUUUU AGAmGmCmUm AmGmAmAmA mUmAmGmCAA GUUAAAAUAA GGCUAGUCCG UUAUCAmAmC mUmUmGmAm AmAmAmAmG mUmGmGmCm AmCmCmGmAm GmUmCmGmG mUmGmCmU*m U*mU*mU	chr6:2994288 3-29942903
G019001	2019	GCCCGUCC GUGGGGGA UGAG	GCCCGUCC GUGGGGGA UGAGGUUU UAGAGCUA GAAAUAGC AAGUUAAA AUAAGGCU AGUCCGUU AUCAACUU GAAAAAGU GGCACCGA GUCGGUGC UUUU	mG*mC*mC*CG UCCGUGGGGG AUGAGGUUUU AGAmGmCmUm AmGmAmAmA mUmAmGmCAA GUUAAAAUAA GGCUAGUCCG UUAUCAmAmC mUmUmGmAm AmAmAmAmG mUmGmGmCm AmCmCmGmAm GmUmCmGmG mUmGmCmU*m	chr6:2994306 2-29943082

				U*mU*mU	
G019002	2020	UCAUCCCC CACGGACG GGCC	UCAUCCCC CACGGACG GGCCGUUU UAGAGCUA GAAAUAGC AAGUUAAA AUAAGGCU AGUCCGUU AUCAACUU GAAAAAGU GGCACCGA GUCGGUGC UUUU	mU*mC*mA*UC CCCCACGGAC GGGCCGUUUU AGAmGmCmUm AmGmAmAmA mUmAmGmCAA GUUAAAAUAA GGCUAGUCCG UUAUCAmAmC mUmUmGmAm AmAmAmAmG mUmGmGmCm AmCmCmGmAm GmUmCmGmG mUmGmCmU*m U*mU*mU	chr6:2994306 3-29943083
G019003	2021	AUCUCGGA CCCGGAGA CUGU	AUCUCGGA CCCGGAGA CUGUGUUU UAGAGCUA GAAAUAGC AAGUUAAA AUAAGGCU AGUCCGUU AUCAACUU GAAAAAGU GGCACCGA GUCGGUGC UUUU	mA*mU*mC*UC GGACCCGGAG ACUGUGUUUU AGAmGmCmUm AmGmAmAmA mUmAmGmCAA GUUAAAAUAA GGCUAGUCCG UUAUCAmAmC mUmUmGmAm AmAmAmAmG mUmGmGmCm AmCmCmGmAm GmUmCmGmG mUmGmCmU*m U*mU*mU	chr6:2994309 2-29943112
G019004	2022	GGGGUCCC GCGGCUUC	GGGGUCCC GCGGCUUC	mG*mG*mG*G UCCCGCGGCU	chr6:2994311 5-29943135

		GGGG	GGGGGUUU UAGAGCUA GAAAUAGC AAGUUAAA AUAAGGCU AGUCCGUU AUCAACUU GAAAAAGU GGCACCGA GUCGGUGC UUUU	UCGGGGGUUU UAGAmGmCmU mAmGmAmAm AmUmAmGmCA AGUUAAAAUA AGGCUAGUCC GUUAUCAmAm CmUmUmGmA mAmAmAmAm GmUmGmGmC mAmCmCmGmA mGmUmCmGm GmUmGmCmU* mU*mU*mU	
G019005	2023	CUCGGGGU CCCGCGGC UUCG	CUCGGGGU CCCGCGGC UUCGGUUU UAGAGCUA GAAAUAGC AAGUUAAA AUAAGGCU AGUCCGUU AUCAACUU GAAAAAGU GGCACCGA GUCGGUGC UUUU	mC*mU*mC*GG GGUCCCGCGG CUUCGGUUUU AGAmGmCmUm AmGmAmAmA mUmAmGmCAA GUUAAAAUAA GGCUAGUCCG UUAUCAmAmC mUmUmGmAm AmAmAmAmG mUmGmGmCm AmCmCmGmAm GmUmCmGmG mUmGmCmU*m U*mU*mU	chr6:29943118-29943138
G019006	2024	UCUCGGGG UCCCGCGG CUUC	UCUCGGGG UCCCGCGG CUUCGUUU UAGAGCUA GAAAUAGC	mU*mC*mU*CG GGGUCCCGCG GCUUCGUUUU AGAmGmCmUm AmGmAmAmA	chr6:29943119-29943139

			AAGUUAAA AUAAGGCU AGUCCGUU AUCAACUU GAAAAAGU GGCACCGA GUCGGUGC UUUU	mUmAmGmCAA GUUAAAAUAA GGCUAGUCCG UUAUCAmAmC mUmUmGmAm AmAmAmAmG mUmGmGmCm AmCmCmGmAm GmUmCmGmG mUmGmCmU*m U*mU*mU	
G019007	2025	GUCUCGGG GUCCCGCG GCUU	GUCUCGGG GUCCCGCG GCUUGUUU UAGAGCUA GAAAUAGC AAGUUAAA AUAAGGCU AGUCCGUU AUCAACUU GAAAAAGU GGCACCGA GUCGGUGC UUUU	mG*mU*mC*UC GGGGUCCCGC GGCUUGUUUU AGAmGmCmUm AmGmAmAmA mUmAmGmCAA GUUAAAAUAA GGCUAGUCCG UUAUCAmAmC mUmUmGmAm AmAmAmAmG mUmGmGmCm AmCmCmGmAm GmUmCmGmG mUmGmCmU*m U*mU*mU	chr6:2994312 0-29943140
G019008	2026	GCAAGGGU CUCGGGGU CCCG	GCAAGGGU CUCGGGGU CCCGGUUU UAGAGCUA GAAAUAGC AAGUUAAA AUAAGGCU AGUCCGUU	mG*mC*mA*AG GGUCUCGGGG UCCCGGUUUU AGAmGmCmUm AmGmAmAmA mUmAmGmCAA GUUAAAAUAA GGCUAGUCCG	chr6:2994312 6-29943146

			AUCAACUU GAAAAAGU GGCACCGA GUCGGUGC UUUU	UUAUCAmAmC mUmUmGmAm AmAmAmAmG mUmGmGmCm AmCmCmGmAm GmUmCmGmG mUmGmCmU*m U*mU*mU	
G019009	2027	GGACCCCG AGACCCUU GCCC	GGACCCCG AGACCCUU GCCCGUUU UAGAGCUA GAAAUAGC AAGUUAAA AUAAGGCU AGUCCGUU AUCAACUU GAAAAAGU GGCACCGA GUCGGUGC UUUU	mG*mG*mA*CC CCGAGACCCU UGCCCGUUUU AGAmGmCmUm AmGmAmAmA mUmAmGmCAA GUUAAAAUAA GGCUAGUCCG UUAUCAmAmC mUmUmGmAm AmAmAmAmG mUmGmGmCm AmCmCmGmAm GmUmCmGmG mUmGmCmU*m U*mU*mU	chr6:2994312 8-29943148
G019010	2028	GACCCCGA GACCCUUG CCCC	GACCCCGA GACCCUUG CCCCGUUU UAGAGCUA GAAAUAGC AAGUUAAA AUAAGGCU AGUCCGUU AUCAACUU GAAAAAGU GGCACCGA	mG*mA*mC*CC CGAGACCCUU GCCCCGUUUU AGAmGmCmUm AmGmAmAmA mUmAmGmCAA GUUAAAAUAA GGCUAGUCCG UUAUCAmAmC mUmUmGmAm AmAmAmAmG	chr6:2994312 9-29943149

			GUCGGUGC UUUU	mUmGmGmCm AmCmCmGmAm GmUmCmGmG mUmGmCmU*m U*mU*mU	
G019011	2029	CGAGACCC UUGCCCCG GGAG	CGAGACCC UUGCCCCG GGAGGUUU UAGAGCUA GAAAUAGC AAGUUAAA AUAAGGCU AGUCCGUU AUCAACUU GAAAAAGU GGCACCGA GUCGGUGC UUUU	mC*mG*mA*GA CCCUUGCCCC GGGAGGUUUU AGAmGmCmUm AmGmAmAmA mUmAmGmCAA GUUAAAAUAA GGCUAGUCCG UUAUCAmAmC mUmUmGmAm AmAmAmAmG mUmGmGmCm AmCmCmGmAm GmUmCmGmG mUmGmCmU*m U*mU*mU	chr6:2994313 4-29943154
G019012	2030	CUCCCGGG GCAAGGGU CUCG	CUCCCGGG GCAAGGGU CUCGGUUU UAGAGCUA GAAAUAGC AAGUUAAA AUAAGGCU AGUCCGUU AUCAACUU GAAAAAGU GGCACCGA GUCGGUGC UUUU	mC*mU*mC*CC GGGGCAAGGG UCUCGGUUUU AGAmGmCmUm AmGmAmAmA mUmAmGmCAA GUUAAAAUAA GGCUAGUCCG UUAUCAmAmC mUmUmGmAm AmAmAmAmG mUmGmGmCm AmCmCmGmAm GmUmCmGmG	chr6:2994313 4-29943154

				mUmGmCmU*mU*mU*mU	
G019013	2031	UCUCCCGGGGCAAGGGUCUC	UCUCCCGGGGCAAGGGUCUCGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU	mU*mC*mU*CCCGGGGCAAGGGUCUCGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	chr6:29943135-29943155
G019014	2032	CUCUCCCGGGGCAAGGGUCU	CUCUCCCGGGGCAAGGGUCUGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU	mC*mU*mC*UCCCGGGGCAAGGGUCUGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	chr6:29943136-29943156
G019015	2033	CCUUGCCC	CCUUGCCC	mC*mC*mU*UG	chr6:2994314

		CGGGAGAG GCCC	CGGGAGAG GCCCGUUU UAGAGCUA GAAAUAGC AAGUUAAA AUAAGGCU AGUCCGUU AUCAACUU GAAAAAGU GGCACCGA GUCGGUGC UUUU	CCCCGGGAGA GGCCCGUUUU AGAmGmCmUm AmGmAmAmA mUmAmGmCAA GUUAAAAUAA GGCUAGUCCG UUAUCAmAmC mUmUmGmAm AmAmAmAmG mUmGmGmCm AmCmCmGmAm GmUmCmGmG mUmGmCmU*m U*mU*mU	0-29943160
G019016	2034	CUGGGCCU CUCCCGGG GCAA	CUGGGCCU CUCCCGGG GCAAGUUU UAGAGCUA GAAAUAGC AAGUUAAA AUAAGGCU AGUCCGUU AUCAACUU GAAAAAGU GGCACCGA GUCGGUGC UUUU	mC*mU*mG*GG CCUCUCCCGG GGCAAGUUUU AGAmGmCmUm AmGmAmAmA mUmAmGmCAA GUUAAAAUAA GGCUAGUCCG UUAUCAmAmC mUmUmGmAm AmAmAmAmG mUmGmGmCm AmCmCmGmAm GmUmCmGmG mUmGmCmU*m U*mU*mU	chr6:2994314 2-29943162
G019017	2035	CCUGGGCC UCUCCCGG GGCA	CCUGGGCC UCUCCCGG GGCAGUUU UAGAGCUA	mC*mC*mU*GG GCCUCUCCCG GGGCAGUUUU AGAmGmCmUm	chr6:2994314 3-29943163

			GAAAUAGC AAGUUAAA AUAAGGCU AGUCCGUU AUCAACUU GAAAAAGU GGCACCGA GUCGGUGC UUUU	AmGmAmAmA mUmAmGmCAA GUUAAAAUAA GGCUAGUCCG UUAUCAmAmC mUmUmGmAm AmAmAmAmG mUmGmGmCm AmCmCmGmAm GmUmCmGmG mUmGmCmU*m U*mU*mU	
G019019	2036	UUUAGGCC AAAAAUCC CCCC	UUUAGGCC AAAAAUCC CCCCGUUU UAGAGCUA GAAAUAGC AAGUUAAA AUAAGGCU AGUCCGUU AUCAACUU GAAAAAGU GGCACCGA GUCGGUGC UUUU	mU*mU*mU*A GGCCAAAAAU CCCCCCGUUU UAGAmGmCmU mAmGmAmAm AmUmAmGmCA AGUUAAAAUA AGGCUAGUCC GUUAUCAmAm CmUmUmGmA mAmAmAmAm GmUmGmGmC mAmCmCmGmA mGmUmCmGm GmUmGmCmU* mU*mU*mU	chr6:2994318 8-29943208
G021208	2037	CGCUGCAG CGCACGGG UACC	CGCUGCAG CGCACGGG UACCGUUU UAGAGCUA GAAAUAGC AAGUUAAA AUAAGGCU	mC*mG*mC*UG CAGCGCACGG GUACCGUUUU AGAmGmCmUm AmGmAmAmA mUmAmGmCAA GUUAAAAUAA	chr6:2994352 8-29943548

			AGUCCGUU AUCAACUU GAAAAAGU GGCACCGA GUCGGUGC UUUU	GGCUAGUCCG UUAUCAmAmC mUmUmGmAm AmAmAmAmG mUmGmGmCm AmCmCmGmAm GmUmCmGmG mUmGmCmU*m U*mU*mU	
G021209	2038	GCUGCAGC GCACGGGU ACCA	GCUGCAGC GCACGGGU ACCAGUUU UAGAGCUA GAAAUAGC AAGUUAAA AUAAGGCU AGUCCGUU AUCAACUU GAAAAAGU GGCACCGA GUCGGUGC UUUU	mG*mC*mU*GC AGCGCACGGG UACCAGUUUU AGAmGmCmUm AmGmAmAmA mUmAmGmCAA GUUAAAAUAA GGCUAGUCCG UUAUCAmAmC mUmUmGmAm AmAmAmAmG mUmGmGmCm AmCmCmGmAm GmUmCmGmG mUmGmCmU*m U*mU*mU	chr6:2994352 9-29943549
G021210	2039	CUGCAGCG CACGGGUA CCAG	CUGCAGCG CACGGGUA CCAGGUUU UAGAGCUA GAAAUAGC AAGUUAAA AUAAGGCU AGUCCGUU AUCAACUU GAAAAAGU	mC*mU*mG*CA GCGCACGGGU ACCAGGUUUU AGAmGmCmUm AmGmAmAmA mUmAmGmCAA GUUAAAAUAA GGCUAGUCCG UUAUCAmAmC mUmUmGmAm	chr6:2994353 0-29943550

			GGCACCGA GUCGGUGC UUUU	AmAmAmAmG mUmGmGmCm AmCmCmGmAm GmUmCmGmG mUmGmCmU*m U*mU*mU	
G018932	2040	CGCACGGG UACCAGGG GCCA	CGCACGGG UACCAGGG GCCAGUUU UAGAGCUA GAAAUAGC AAGUUAAA AUAAGGCU AGUCCGUU AUCAACUU GAAAAAGU GGCACCGA GUCGGUGC UUUU	mC*mG*mC*AC GGGUACCAGG GGCCAGUUUU AGAmGmCmUm AmGmAmAmA mUmAmGmCAA GUUAAAAUAA GGCUAGUCCG UUAUCAmAmC mUmUmGmAm AmAmAmAmG mUmGmGmCm AmCmCmGmAm GmUmCmGmG mUmGmCmU*m U*mU*mU	chr6:2994353 6-29943556
G018933	2041	GCACGGGU ACCAGGGG CCAC	GCACGGGU ACCAGGGG CCACGUUU UAGAGCUA GAAAUAGC AAGUUAAA AUAAGGCU AGUCCGUU AUCAACUU GAAAAAGU GGCACCGA GUCGGUGC UUUU	mG*mC*mA*CG GGUACCAGGG GCCACGUUUU AGAmGmCmUm AmGmAmAmA mUmAmGmCAA GUUAAAAUAA GGCUAGUCCG UUAUCAmAmC mUmUmGmAm AmAmAmAmG mUmGmGmCm AmCmCmGmAm	chr6:2994353 7-29943557

				GmUmCmGmG mUmGmCmU*m U*mU*mU	
G018934	2042	CACGGGUA CCAGGGGC CACG	CACGGGUA CCAGGGGC CACGGUUU UAGAGCUA GAAAUAGC AAGUUAAA AUAAGGCU AGUCCGUU AUCAACUU GAAAAAGU GGCACCGA GUCGGUGC UUUU	mC*mA*mC*GG GUACCAGGGG CCACGGUUUU AGAmGmCmUm AmGmAmAmA mUmAmGmCAA GUUAAAAUAA GGCUAGUCCG UUAUCAmAmC mUmUmGmAm AmAmAmAmG mUmGmGmCm AmCmCmGmAm GmUmCmGmG mUmGmCmU*m U*mU*mU	chr6:2994353 8-29943558
G018935	2043	GGGAGGCG CCCCGUGG CCCC	GGGAGGCG CCCCGUGG CCCCGUUU UAGAGCUA GAAAUAGC AAGUUAAA AUAAGGCU AGUCCGUU AUCAACUU GAAAAAGU GGCACCGA GUCGGUGC UUUU	mG*mG*mG*A GGCGCCCCGU GGCCCCGUUU UAGAmGmCmU mAmGmAmAm AmUmAmGmCA AGUUAAAAUA AGGCUAGUCC GUUAUCAmAm CmUmUmGmA mAmAmAmAm GmUmGmGmC mAmCmCmGmA mGmUmCmGm GmUmGmCmU* mU*mU*mU	chr6:2994354 9-29943569

G018936	2044	GCGAUCAGGGAGGCGCCCCG	GCGAUCAGGGAGGCGCCCCGGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU	mG*mC*mG*AUCAGGGAGGCGCCCCGGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	chr6:29943556-29943576
G021211	2045	UCCUUGUGGGAGGCCAGCCC	UCCUUGUGGGAGGCCAGCCCGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU	mU*mC*mC*UUGUGGGAGGCCAGCCCGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	chr6:29943589-29943609
G018938	2046	CUCCUUGUGGGAGGCCAGCC	CUCCUUGUGGGAGGCCAGCCGUUU	mC*mU*mC*CUUGUGGGAGGCCAGCCGUUUU	chr6:29943590-29943610

			UAGAGCUA GAAAUAGC AAGUUAAA AUAAGGCU AGUCCGUU AUCAACUU GAAAAAGU GGCACCGA GUCGGUGC UUUU	AGAmGmCmUm AmGmAmAmA mUmAmGmCAA GUUAAAAUAA GGCUAGUCCG UUAUCAmAmC mUmUmGmAm AmAmAmAmG mUmGmGmCm AmCmCmGmAm GmUmCmGmG mUmGmCmU*m U*mU*mU	
G018939	2047	GGCUGGCC UCCCACAA GGAG	GGCUGGCC UCCCACAA GGAGGUUU UAGAGCUA GAAAUAGC AAGUUAAA AUAAGGCU AGUCCGUU AUCAACUU GAAAAAGU GGCACCGA GUCGGUGC UUUU	mG*mG*mC*UG GCCUCCCACA AGGAGGUUUU AGAmGmCmUm AmGmAmAmA mUmAmGmCAA GUUAAAAUAA GGCUAGUCCG UUAUCAmAmC mUmUmGmAm AmAmAmAmG mUmGmGmCm AmCmCmGmAm GmUmCmGmG mUmGmCmU*m U*mU*mU	chr6:2994359 0-29943610
G018940	2048	UUGUCUCC CCUCCUUG UGGG	UUGUCUCC CCUCCUUG UGGGGUUU UAGAGCUA GAAAUAGC AAGUUAAA	mU*mU*mG*UC UCCCCUCCUU GUGGGGUUUU AGAmGmCmUm AmGmAmAmA mUmAmGmCAA	chr6:2994359 9-29943619

			AUAAGGCU AGUCCGUU AUCAACUU GAAAAAGU GGCACCGA GUCGGUGC UUUU	GUUAAAAUAA GGCUAGUCCG UUAUCAmAmC mUmUmGmAm AmAmAmAmG mUmGmGmCm AmCmCmGmAm GmUmCmGmG mUmGmCmU*m U*mU*mU	
G018941	2049	CCACAAGG AGGGGAGA CAAU	CCACAAGG AGGGGAGA CAAUGUUU UAGAGCUA GAAAUAGC AAGUUAAA AUAAGGCU AGUCCGUU AUCAACUU GAAAAAGU GGCACCGA GUCGGUGC UUUU	mC*mC*mA*CA AGGAGGGGAG ACAAUGUUUU AGAmGmCmUm AmGmAmAmA mUmAmGmCAA GUUAAAAUAA GGCUAGUCCG UUAUCAmAmC mUmUmGmAm AmAmAmAmG mUmGmGmCm AmCmCmGmAm GmUmCmGmG mUmGmCmU*m U*mU*mU	chr6:2994360 0-29943620
G018942	2050	CACAAGGA GGGGAGAC AAUU	CACAAGGA GGGGAGAC AAUUGUUU UAGAGCUA GAAAUAGC AAGUUAAA AUAAGGCU AGUCCGUU AUCAACUU	mC*mA*mC*AA GGAGGGGAGA CAAUUGUUUU AGAmGmCmUm AmGmAmAmA mUmAmGmCAA GUUAAAAUAA GGCUAGUCCG UUAUCAmAmC	chr6:2994360 1-29943621

			GAAAAAGU GGCACCGA GUCGGUGC UUUU	mUmUmGmAm AmAmAmAmG mUmGmGmCm AmCmCmGmAm GmUmCmGmG mUmGmCmU*m U*mU*mU	
G018943	2051	CAAUUGUC UCCCCUCC UUGU	CAAUUGUC UCCCCUCC UUGUGUUU UAGAGCUA GAAAUAGC AAGUUAAA AUAAGGCU AGUCCGUU AUCAACUU GAAAAAGU GGCACCGA GUCGGUGC UUUU	mC*mA*mA*UU GUCUCCCCUC CUUGUGUUUU AGAmGmCmUm AmGmAmAmA mUmAmGmCAA GUUAAAAUAA GGCUAGUCCG UUAUCAmAmC mUmUmGmAm AmAmAmAmG mUmGmGmCm AmCmCmGmAm GmUmCmGmG mUmGmCmU*m U*mU*mU	chr6:2994360 2-29943622
G018944	2052	CCAAUUGU CUCCCCUC CUUG	CCAAUUGU CUCCCCUC CUUGGUUU UAGAGCUA GAAAUAGC AAGUUAAA AUAAGGCU AGUCCGUU AUCAACUU GAAAAAGU GGCACCGA GUCGGUGC	mC*mC*mA*AU UGUCUCCCCU CCUUGGUUUU AGAmGmCmUm AmGmAmAmA mUmAmGmCAA GUUAAAAUAA GGCUAGUCCG UUAUCAmAmC mUmUmGmAm AmAmAmAmG mUmGmGmCm	chr6:2994360 3-29943623

			UUUU	AmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	
G018945	2053	AUCCCUCGAAUACUGAUGAG	AUCCCUCGAAUACUGAUGAGGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU	mA*mU*mC*CCUCGAAUACUGAUGAGGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	chr6:29943774-29943794
G018946	2054	AACCACUCAUCAGUAUUCGA	AACCACUCAUCAGUAUUCGAGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU	mA*mA*mC*CACUCAUCAGUAUUCGAGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	chr6:29943779-29943799

				U*mU*mU	
G018947	2055	GAACCACU CAUCAGUA UUCG	GAACCACU CAUCAGUA UUCGGUUU UAGAGCUA GAAAUAGC AAGUUAAA AUAAGGCU AGUCCGUU AUCAACUU GAAAAAGU GGCACCGA GUCGGUGC UUUU	mG*mA*mA*CC ACUCAUCAGU AUUCGGUUUU AGAmGmCmUm AmGmAmAmA mUmAmGmCAA GUUAAAAUAA GGCUAGUCCG UUAUCAmAmC mUmUmGmAm AmAmAmAmG mUmGmGmCm AmCmCmGmAm GmUmCmGmG mUmGmCmU*m U*mU*mU	chr6:2994378 0-29943800
G018948	2056	GAGGAAAA GUCACGGG CCCA	GAGGAAAA GUCACGGG CCCAGUUU UAGAGCUA GAAAUAGC AAGUUAAA AUAAGGCU AGUCCGUU AUCAACUU GAAAAAGU GGCACCGA GUCGGUGC UUUU	mG*mA*mG*G AAAAGUCACG GGCCCAGUUU UAGAmGmCmU mAmGmAmAm AmUmAmGmCA AGUUAAAAUA AGGCUAGUCC GUUAUCAmAm CmUmUmGmA mAmAmAmAm GmUmGmGmC mAmCmCmGmA mGmUmCmGm GmUmGmCmU* mU*mU*mU	chr6:2994382 2-29943842
G018949	2057	GGCCCGUG ACUUUUCC	GGCCCGUG ACUUUUCC	mG*mG*mC*CC GUGACUUUUC	chr6:2994382 4-29943844

		UCUC	UCUCGUUU UAGAGCUA GAAAUAGC AAGUUAAA AUAAGGCU AGUCCGUU AUCAACUU GAAAAAGU GGCACCGA GUCGGUGC UUUU	CUCUCGUUUU AGAmGmCmUm AmGmAmAmA mUmAmGmCAA GUUAAAAUAA GGCUAGUCCG UUAUCAmAmC mUmUmGmAm AmAmAmAmG mUmGmGmCm AmCmCmGmAm GmUmCmGmG mUmGmCmU*m U*mU*mU	
G018950	2058	UGCUUCAC ACUCAAUG UGUG	UGCUUCAC ACUCAAUG UGUGGUUU UAGAGCUA GAAAUAGC AAGUUAAA AUAAGGCU AGUCCGUU AUCAACUU GAAAAAGU GGCACCGA GUCGGUGC UUUU	mU*mG*mC*UU CACACUCAAU GUGUGGUUUU AGAmGmCmUm AmGmAmAmA mUmAmGmCAA GUUAAAAUAA GGCUAGUCCG UUAUCAmAmC mUmUmGmAm AmAmAmAmG mUmGmGmCm AmCmCmGmAm GmUmCmGmG mUmGmCmU*m U*mU*mU	chr6:29943857-29943877
G018951	2059	GCUUCACA CUCAAUGU GUGU	GCUUCACA CUCAAUGU GUGUGUUU UAGAGCUA GAAAUAGC	mG*mC*mU*UC ACACUCAAUG UGUGUGUUUU AGAmGmCmUm AmGmAmAmA	chr6:29943858-29943878

			AAGUUAAA AUAAGGCU AGUCCGUU AUCAACUU GAAAAAGU GGCACCGA GUCGGUGC UUUU	mUmAmGmCAA GUUAAAAUAA GGCUAGUCCG UUAUCAmAmC mUmUmGmAm AmAmAmAmG mUmGmGmCm AmCmCmGmAm GmUmCmGmG mUmGmCmU*m U*mU*mU	
G018952	2060	CUUCACAC UCAAUGUG UGUG	CUUCACAC UCAAUGUG UGUGGUUU UAGAGCUA GAAAUAGC AAGUUAAA AUAAGGCU AGUCCGUU AUCAACUU GAAAAAGU GGCACCGA GUCGGUGC UUUU	mC*mU*mU*CA CACUCAAUGU GUGUGGUUUU AGAmGmCmUm AmGmAmAmA mUmAmGmCAA GUUAAAAUAA GGCUAGUCCG UUAUCAmAmC mUmUmGmAm AmAmAmAmG mUmGmGmCm AmCmCmGmAm GmUmCmGmG mUmGmCmU*m U*mU*mU	chr6:29943859-29943879
G018953	2061	UUCACACU CAAUGUGU GUGG	UUCACACU CAAUGUGU GUGGGUUU UAGAGCUA GAAAUAGC AAGUUAAA AUAAGGCU AGUCCGUU	mU*mU*mC*AC ACUCAAUGUG UGUGGGUUUU AGAmGmCmUm AmGmAmAmA mUmAmGmCAA GUUAAAAUAA GGCUAGUCCG	chr6:29943860-29943880

			AUCAACUU GAAAAAGU GGCACCGA GUCGGUGC UUUU	UUAUCAmAmC mUmUmGmAm AmAmAmAmG mUmGmGmCm AmCmCmGmAm GmUmCmGmG mUmGmCmU*m U*mU*mU	
G018954	2062	UUGAGAAU GGACAGGA CACC	UUGAGAAU GGACAGGA CACCGUUU UAGAGCUA GAAAUAGC AAGUUAAA AUAAGGCU AGUCCGUU AUCAACUU GAAAAAGU GGCACCGA GUCGGUGC UUUU	mU*mU*mG*A GAAUGGACAG GACACCGUUU UAGAmGmCmU mAmGmAmAm AmUmAmGmCA AGUUAAAAUA AGGCUAGUCC GUUAUCAmAm CmUmUmGmA mAmAmAmAm GmUmGmGmC mAmCmCmGmA mGmUmCmGm GmUmGmCmU* mU*mU*mU	chr6:2994402 6-29944046
G021205	2063	AGGCAUUU UGCAUCUG UCAU	AGGCAUUU UGCAUCUG UCAUGUUU UAGAGCUA GAAAUAGC AAGUUAAA AUAAGGCU AGUCCGUU AUCAACUU GAAAAAGU GGCACCGA	mA*mG*mG*CA UUUUGCAUCU GUCAUGUUUU AGAmGmCmUm AmGmAmAmA mUmAmGmCAA GUUAAAAUAA GGCUAGUCCG UUAUCAmAmC mUmUmGmAm AmAmAmAmG	chr6:2994407 7-29944097

			GUCGGUGC UUUU	mUmGmGmCm AmCmCmGmAm GmUmCmGmG mUmGmCmU*m U*mU*mU	
G021206	2064	CAGGCAUU UUGCAUCU GUCA	CAGGCAUU UUGCAUCU GUCAGUUU UAGAGCUA GAAAUAGC AAGUUAAA AUAAGGCU AGUCCGUU AUCAACUU GAAAAAGU GGCACCGA GUCGGUGC UUUU	mC*mA*mG*GC AUUUUGCAUC UGUCAGUUUU AGAmGmCmUm AmGmAmAmA mUmAmGmCAA GUUAAAAUAA GGCUAGUCCG UUAUCAmAmC mUmUmGmAm AmAmAmAmG mUmGmGmCm AmCmCmGmAm GmUmCmGmG mUmGmCmU*m U*mU*mU	chr6:2994407 8-29944098
G018955	2065	AGGGGCCC UGACCCUG CUAA	AGGGGCCC UGACCCUG CUAAGUUU UAGAGCUA GAAAUAGC AAGUUAAA AUAAGGCU AGUCCGUU AUCAACUU GAAAAAGU GGCACCGA GUCGGUGC UUUU	mA*mG*mG*G GCCCUGACCC UGCUAAGUUU UAGAmGmCmU mAmGmAmAm AmUmAmGmCA AGUUAAAAUA AGGCUAGUCC GUUAUCAmAm CmUmUmGmA mAmAmAmAm GmUmGmGmC mAmCmCmGmA mGmUmCmGm	chr6:2994445 8-29944478

				GmUmGmCmU* mU*mU*mU	
G018956	2066	UGGGAAAA GAGGGGAA GGUG	UGGGAAAA GAGGGGAA GGUGGUUU UAGAGCUA GAAAUAGC AAGUUAAA AUAAGGCU AGUCCGUU AUCAACUU GAAAAAGU GGCACCGA GUCGGUGC UUUU	mU*mG*mG*G AAAAGAGGGG AAGGUGGUUU UAGAmGmCmU mAmGmAmAm AmUmAmGmCA AGUUAAAAUA AGGCUAGUCC GUUAUCAmAm CmUmUmGmA mAmAmAmAm GmUmGmGmC mAmCmCmGmA mGmUmCmGm GmUmGmCmU* mU*mU*mU	chr6:2994447 8-29944498
G018957	2067	UGGAGGAG GAAGAGCU CAGG	UGGAGGAG GAAGAGCU CAGGGUUU UAGAGCUA GAAAUAGC AAGUUAAA AUAAGGCU AGUCCGUU AUCAACUU GAAAAAGU GGCACCGA GUCGGUGC UUUU	mU*mG*mG*A GGAGGAAGAG CUCAGGGUUU UAGAmGmCmU mAmGmAmAm AmUmAmGmCA AGUUAAAAUA AGGCUAGUCC GUUAUCAmAm CmUmUmGmA mAmAmAmAm GmUmGmGmC mAmCmCmGmA mGmUmCmGm GmUmGmCmU* mU*mU*mU	chr6:2994459 7-29944617
G018958	2068	UGAGAUUU	UGAGAUUU	mU*mG*mA*G	chr6:2994464

		CUUGUCUC ACUG	CUUGUCUC ACUGGUUU UAGAGCUA GAAAUAGC AAGUUAAA AUAAGGCU AGUCCGUU AUCAACUU GAAAAAGU GGCACCGA GUCGGUGC UUUU	AUUUCUUGUC UCACUGGUUU UAGAmGmCmU mAmGmAmAm AmUmAmGmCA AGUUAAAAUA AGGCUAGUCC GUUAUCAmAm CmUmUmGmA mAmAmAmAm GmUmGmGmC mAmCmCmGmA mGmUmCmGm GmUmGmCmU* mU*mU*mU	2-29944662
G018959	2069	GAGAUUUC UUGUCUCA CUGA	GAGAUUUC UUGUCUCA CUGAGUUU UAGAGCUA GAAAUAGC AAGUUAAA AUAAGGCU AGUCCGUU AUCAACUU GAAAAAGU GGCACCGA GUCGGUGC UUUU	mG*mA*mG*A UUUCUUGUCU CACUGAGUUU UAGAmGmCmU mAmGmAmAm AmUmAmGmCA AGUUAAAAUA AGGCUAGUCC GUUAUCAmAm CmUmUmGmA mAmAmAmAm GmUmGmGmC mAmCmCmGmA mGmUmCmGm GmUmGmCmU* mU*mU*mU	chr6:2994464 3-29944663
G018960	2070	UAAAGCAC CUGUUAAA AUGA	UAAAGCAC CUGUUAAA AUGAGUUU UAGAGCUA	mU*mA*mA*A GCACCUGUUA AAAUGAGUUU UAGAmGmCmU	chr6:2994477 2-29944792

			GAAAUAGC AAGUUAAA AUAAGGCU AGUCCGUU AUCAACUU GAAAAAGU GGCACCGA GUCGGUGC UUUU	mAmGmAmAm AmUmAmGmCA AGUUAAAAUA AGGCUAGUCC GUUAUCAmAm CmUmUmGmA mAmAmAmAm GmUmGmGmC mAmCmCmGmA mGmUmCmGm GmUmGmCmU* mU*mU*mU	
G018961	2071	AAUCUGUC CUUCAUUU UAAC	AAUCUGUC CUUCAUUU UAACGUUU UAGAGCUA GAAAUAGC AAGUUAAA AUAAGGCU AGUCCGUU AUCAACUU GAAAAAGU GGCACCGA GUCGGUGC UUUU	mA*mA*mU*CU GUCCUUCAUU UUAACGUUUU AGAmGmCmUm AmGmAmAmA mUmAmGmCAA GUUAAAAUAA GGCUAGUCCG UUAUCAmAmC mUmUmGmAm AmAmAmAmG mUmGmGmCm AmCmCmGmAm GmUmCmGmG mUmGmCmU*m U*mU*mU	chr6:29944782-29944802
G018962	2072	GUCACAGG GGAAGGUC CCUG	GUCACAGG GGAAGGUC CCUGGUUU UAGAGCUA GAAAUAGC AAGUUAAA AUAAGGCU	mG*mU*mC*AC AGGGGAAGGU CCCUGGUUUU AGAmGmCmUm AmGmAmAmA mUmAmGmCAA GUUAAAAUAA	chr6:29944850-29944870

			AGUCCGUU AUCAACUU GAAAAAGU GGCACCGA GUCGGUGC UUUU	GGCUAGUCCG UUAUCAmAmC mUmUmGmAm AmAmAmAmG mUmGmGmCm AmCmCmGmAm GmUmCmGmG mUmGmCmU*m U*mU*mU	
G018964	2073	AAACAUGA AGAAAGCA GGUG	AAACAUGA AGAAAGCA GGUGGUUU UAGAGCUA GAAAUAGC AAGUUAAA AUAAGGCU AGUCCGUU AUCAACUU GAAAAAGU GGCACCGA GUCGGUGC UUUU	mA*mA*mA*CA UGAAGAAAGC AGGUGGUUUU AGAmGmCmUm AmGmAmAmA mUmAmGmCAA GUUAAAAUAA GGCUAGUCCG UUAUCAmAmC mUmUmGmAm AmAmAmAmG mUmGmGmCm AmCmCmGmAm GmUmCmGmG mUmGmCmU*m U*mU*mU	chr6:2994490 7-29944927
G018966	2074	UGUCCUGU GAGAUACC AGAA	UGUCCUGU GAGAUACC AGAAGUUU UAGAGCUA GAAAUAGC AAGUUAAA AUAAGGCU AGUCCGUU AUCAACUU GAAAAAGU	mU*mG*mU*CC UGUGAGAUAC CAGAAGUUUU AGAmGmCmUm AmGmAmAmA mUmAmGmCAA GUUAAAAUAA GGCUAGUCCG UUAUCAmAmC mUmUmGmAm	chr6:2994502 4-29945044

			GGCACCGAGUCGGUGCUUUU	AmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmGmCmU*mU*mU*mU	
G018967	2075	AUGAAGGAGGCUGAUGCCUG	AUGAAGGAGGCUGAUGCCUGGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU	mA*mU*mG*AAGGAGGCUGAUGCCUGGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	chr6:29945097-29945117
G018968	2076	AGGCUGAUGCCUGAGGUCCU	AGGCUGAUGCCUGAGGUCCUGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU	mA*mG*mG*CUGAUGCCUGAGGUCCUGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAm	chr6:29945104-29945124

				GmUmCmGmG mUmGmCmU*m U*mU*mU	
G018969	2077	GGCUGAUG CCUGAGGU CCUU	GGCUGAUG CCUGAGGU CCUUGUUU UAGAGCUA GAAAUAGC AAGUUAAA AUAAGGCU AGUCCGUU AUCAACUU GAAAAAGU GGCACCGA GUCGGUGC UUUU	mG*mG*mC*UG AUGCCUGAGG UCCUUGUUUU AGAmGmCmUm AmGmAmAmA mUmAmGmCAA GUUAAAAUAA GGCUAGUCCG UUAUCAmAmC mUmUmGmAm AmAmAmAmG mUmGmGmCm AmCmCmGmAm GmUmCmGmG mUmGmCmU*m U*mU*mU	chr6:2994510 5-29945125
G018970	2078	CACAAUAU CCCAAGGA CCUC	CACAAUAU CCCAAGGA CCUCGUUU UAGAGCUA GAAAUAGC AAGUUAAA AUAAGGCU AGUCCGUU AUCAACUU GAAAAAGU GGCACCGA GUCGGUGC UUUU	mC*mA*mC*AA UAUCCCAAGG ACCUCGUUUU AGAmGmCmUm AmGmAmAmA mUmAmGmCAA GUUAAAAUAA GGCUAGUCCG UUAUCAmAmC mUmUmGmAm AmAmAmAmG mUmGmGmCm AmCmCmGmAm GmUmCmGmG mUmGmCmU*m U*mU*mU	chr6:2994511 6-29945136

G018971	2079	GGUCCUUG GGAUAUUG UGUU	GGUCCUUG GGAUAUUG UGUUGUUU UAGAGCUA GAAAUAGC AAGUUAAA AUAAGGCU AGUCCGUU AUCAACUU GAAAAAGU GGCACCGA GUCGGUGC UUUU	mG*mG*mU*CC UUGGGAUAUU GUGUUGUUUU AGAmGmCmUm AmGmAmAmA mUmAmGmCAA GUUAAAAUAA GGCUAGUCCG UUAUCAmAmC mUmUmGmAm AmAmAmAmG mUmGmGmCm AmCmCmGmAm GmUmCmGmG mUmGmCmU*m U*mU*mU	chr6:2994511 8-29945138
G018972	2080	GUCCUUGG GAUAUUGU GUUU	GUCCUUGG GAUAUUGU GUUUGUUU UAGAGCUA GAAAUAGC AAGUUAAA AUAAGGCU AGUCCGUU AUCAACUU GAAAAAGU GGCACCGA GUCGGUGC UUUU	mG*mU*mC*CU UGGGAUAUUG UGUUUGUUUU AGAmGmCmUm AmGmAmAmA mUmAmGmCAA GUUAAAAUAA GGCUAGUCCG UUAUCAmAmC mUmUmGmAm AmAmAmAmG mUmGmGmCm AmCmCmGmAm GmUmCmGmG mUmGmCmU*m U*mU*mU	chr6:2994511 9-29945139
G018973	2081	CUCCCAAA CACAAUAU CCCA	CUCCCAAA CACAAUAU CCCAGUUU	mC*mU*mC*CC AAACACAAUA UCCCAGUUUU	chr6:2994512 4-29945144

			UAGAGCUA GAAAUAGC AAGUUAAA AUAAGGCU AGUCCGUU AUCAACUU GAAAAAGU GGCACCGA GUCGGUGC UUUU	AGAmGmCmUm AmGmAmAmA mUmAmGmCAA GUUAAAAUAA GGCUAGUCCG UUAUCAmAmC mUmUmGmAm AmAmAmAmG mUmGmGmCm AmCmCmGmAm GmUmCmGmG mUmGmCmU*m U*mU*mU	
G018974	2082	UCCUCUAG CCACAUCU UCUG	UCCUCUAG CCACAUCU UCUGGUUU UAGAGCUA GAAAUAGC AAGUUAAA AUAAGGCU AGUCCGUU AUCAACUU GAAAAAGU GGCACCGA GUCGGUGC UUUU	mU*mC*mC*UC UAGCCACAUC UUCUGGUUUU AGAmGmCmUm AmGmAmAmA mUmAmGmCAA GUUAAAAUAA GGCUAGUCCG UUAUCAmAmC mUmUmGmAm AmAmAmAmG mUmGmGmCm AmCmCmGmAm GmUmCmGmG mUmGmCmU*m U*mU*mU	chr6:2994517 6-29945196
G018975	2083	ACAGAAGA UGUGGCUA GAGG	ACAGAAGA UGUGGCUA GAGGGUUU UAGAGCUA GAAAUAGC AAGUUAAA	mA*mC*mA*GA AGAUGUGGCU AGAGGGUUUU AGAmGmCmUm AmGmAmAmA mUmAmGmCAA	chr6:2994517 7-29945197

			AUAAGGCU AGUCCGUU AUCAACUU GAAAAAGU GGCACCGA GUCGGUGC UUUU	GUUAAAAUAA GGCUAGUCCG UUAUCAmAmC mUmUmGmAm AmAmAmAmG mUmGmGmCm AmCmCmGmAm GmUmCmGmG mUmGmCmU*m U*mU*mU	
G018976	2084	CCUCUAGC CACAUCUU CUGU	CCUCUAGC CACAUCUU CUGUGUUU UAGAGCUA GAAAUAGC AAGUUAAA AUAAGGCU AGUCCGUU AUCAACUU GAAAAAGU GGCACCGA GUCGGUGC UUUU	mC*mC*mU*CU AGCCACAUCU UCUGUGUUUU AGAmGmCmUm AmGmAmAmA mUmAmGmCAA GUUAAAAUAA GGCUAGUCCG UUAUCAmAmC mUmUmGmAm AmAmAmAmG mUmGmGmCm AmCmCmGmAm GmUmCmGmG mUmGmCmU*m U*mU*mU	chr6:2994517 7-29945197
G018977	2085	CCCACAGA AGAUGUGG CUAG	CCCACAGA AGAUGUGG CUAGGUUU UAGAGCUA GAAAUAGC AAGUUAAA AUAAGGCU AGUCCGUU AUCAACUU	mC*mC*mC*AC AGAAGAUGUG GCUAGGUUUU AGAmGmCmUm AmGmAmAmA mUmAmGmCAA GUUAAAAUAA GGCUAGUCCG UUAUCAmAmC	chr6:2994518 0-29945200

			GAAAAAGU GGCACCGA GUCGGUGC UUUU	mUmUmGmAm AmAmAmAmG mUmGmGmCm AmCmCmGmAm GmUmCmGmG mUmGmCmU*m U*mU*mU	
G018978	2086	GUCAGAUC CCACAGAA GAUG	GUCAGAUC CCACAGAA GAUGGUUU UAGAGCUA GAAAUAGC AAGUUAAA AUAAGGCU AGUCCGUU AUCAACUU GAAAAAGU GGCACCGA GUCGGUGC UUUU	mG*mU*mC*AG AUCCCACAGA AGAUGGUUUU AGAmGmCmUm AmGmAmAmA mUmAmGmCAA GUUAAAAUAA GGCUAGUCCG UUAUCAmAmC mUmUmGmAm AmAmAmAmG mUmGmGmCm AmCmCmGmAm GmUmCmGmG mUmGmCmU*m U*mU*mU	chr6:2994518 7-29945207
G018979	2087	AUCUUCUG UGGGAUCU GACC	AUCUUCUG UGGGAUCU GACCGUUU UAGAGCUA GAAAUAGC AAGUUAAA AUAAGGCU AGUCCGUU AUCAACUU GAAAAAGU GGCACCGA GUCGGUGC	mA*mU*mC*UU CUGUGGGAUC UGACCGUUUU AGAmGmCmUm AmGmAmAmA mUmAmGmCAA GUUAAAAUAA GGCUAGUCCG UUAUCAmAmC mUmUmGmAm AmAmAmAmG mUmGmGmCm	chr6:2994518 8-29945208

			UUUU	AmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	
G018980	2088	CCCAGGCAGUGACAGUGCCC	CCCAGGCAGUGACAGUGCCCGUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU	mC*mC*mC*AGGCAGUGACAGUGCCCGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	chr6:29945228-29945248
G018981	2089	CUGGGCACUGUCACUGCCUG	CUGGGCACUGUCACUGCCUGGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU	mC*mU*mG*GGCACUGUCACUGCCUGGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	chr6:29945230-29945250

				U*mU*mU	
G018982	2090	CCUGGGCACUGUCACUGCCU	CCUGGGCACUGUCACUGCCUGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU	mC*mC*mU*GGGCACUGUCACUGCCUGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU	chr6:29945231-29945251
G021207	2091	CCCUGGGCACUGUCACUGCC	CCCUGGGCACUGUCACUGCCGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU	mC*mC*mC*UGGGCACUGUCACUGCCGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU	chr6:29945232-29945252
G018987	2092	UUGGGUGUUGGGCGGA	UUGGGUGUUGGGCGGA	mU*mU*mG*GGUGUUGGGCG	chr6:29945308-29945328

		ACAG	ACAGGUUU UAGAGCUA GAAAUAGC AAGUUAAA AUAAGGCU AGUCCGUU AUCAACUU GAAAAAGU GGCACCGA GUCGGUGC UUUU	GAACAGGUUU UAGAmGmCmU mAmGmAmAm AmUmAmGmCA AGUUAAAAUA AGGCUAGUCC GUUAUCAmAm CmUmUmGmA mAmAmAmAm GmUmGmGmC mAmCmCmGmA mGmUmCmGm GmUmGmCmU* mU*mU*mU	
G018988	2093	UGGAUGUA UUGAGCAU GCGA	UGGAUGUA UUGAGCAU GCGAGUUU UAGAGCUA GAAAUAGC AAGUUAAA AUAAGGCU AGUCCGUU AUCAACUU GAAAAAGU GGCACCGA GUCGGUGC UUUU	mU*mG*mG*A UGUAUUGAGC AUGCGAGUUU UAGAmGmCmU mAmGmAmAm AmUmAmGmCA AGUUAAAAUA AGGCUAGUCC GUUAUCAmAm CmUmUmGmA mAmAmAmAm GmUmGmGmC mAmCmCmGmA mGmUmCmGm GmUmGmCmU* mU*mU*mU	chr6:2994536 1-29945381
G018989	2094	GGAUGUAU UGAGCAUG CGAU	GGAUGUAU UGAGCAUG CGAUGUUU UAGAGCUA GAAAUAGC	mG*mG*mA*U GUAUUGAGCA UGCGAUGUUU UAGAmGmCmU mAmGmAmAm	chr6:2994536 2-29945382

			AAGUUAAA AUAAGGCU AGUCCGUU AUCAACUU GAAAAAGU GGCACCGA GUCGGUGC UUUU	AmUmAmGmCA AGUUAAAAUA AGGCUAGUCC GUUAUCAmAm CmUmUmGmA mAmAmAmAm GmUmGmGmC mAmCmCmGmA mGmUmCmGm GmUmGmCmU* mU*mU*mU	
G018963	2095	AACAUGAA GAAAGCAG GUGU	AACAUGAA GAAAGCAG GUGUGUUU UAGAGCUA GAAAUAGC AAGUUAAA AUAAGGCU AGUCCGUU AUCAACUU GAAAAAGU GGCACCGA GUCGGUGC UUUU	mA*mA*mC*AU GAAGAAAGCA GGUGUGUUUU AGAmGmCmUm AmGmAmAmA mUmAmGmCAA GUUAAAAUAA GGCUAGUCCG UUAUCAmAmC mUmUmGmAm AmAmAmAmG mUmGmGmCm AmCmCmGmAm GmUmCmGmG mUmGmCmU*m U*mU*mU	chr6:3138254 3-31382563

[00193] В некоторых вариантах осуществления эффективность HLA-A-направленной РНК определяют путем измерения уровней белка HLA-A на поверхности клетки. В некоторых вариантах осуществления уровни белка HLA-A измеряют с помощью проточной цитометрии (*например*, с антителом к HLA-A2 и/или HLA-A3). В некоторых вариантах осуществления популяция клеток является по меньшей мере на 65% отрицательной по HLA-A, как измерено с помощью проточной цитометрии, относительно популяции немодифицированных клеток. В некоторых вариантах осуществления популяция клеток является по меньшей мере на 70% отрицательной по HLA-A, как измерено с помощью проточной цитометрии, относительно популяции

немодифицированных клеток. В некоторых вариантах осуществления популяция клеток является по меньшей мере на 80% отрицательной по HLA-A, как измерено с помощью проточной цитометрии, относительно популяции немодифицированных клеток. В некоторых вариантах осуществления популяция клеток является по меньшей мере на 90% отрицательной по HLA-A, как измерено с помощью проточной цитометрии, относительно популяции немодифицированных клеток. В некоторых вариантах осуществления популяция клеток является по меньшей мере на 95% отрицательной по HLA-A, как измерено с помощью проточной цитометрии, относительно популяции немодифицированных клеток. В некоторых вариантах осуществления популяция клеток является по меньшей мере на 100% отрицательной по HLA-A, как измерено с помощью проточной цитометрии, относительно популяции немодифицированных клеток.

[00194] В некоторых вариантах осуществления эффективность B2M-направленной РНК или HLA-A-направленной можно определить путем измерения ответа иммунных клеток in vitro или in vivo (*например*, CD8+ Т-клеток) на генетически модифицированную целевую клетку по сравнению с немодифицированной клеткой. Например, сниженный ответ CD8+ Т-клеток свидетельствует об эффективной B2M-направленной РНК или HLA-A-направленной РНК. Реакции CD8+ Т-клеток можно оценить с помощью анализа, который измеряет реакции активации CD8+ Т-клеток, *например*, пролиферацию CD8+ Т-клеток, экспрессию маркеров активации и/или продукцию цитокинов (IL-2, IFN-γ, TNF-α) (*например*, проточная цитометрия, ИФА). Реакцию CD8+ Т-клеток можно оценить in vitro или in vivo. В некоторых вариантах осуществления реакцию CD8+ Т-клеток можно оценить путем совместного культивирования генетически модифицированных клеток с CD8+ Т-клетками in vitro. В некоторых вариантах осуществления активность CD8+ Т-клеток можно оценить на модели in vivo, *например*, на модели грызунов. В модели in vivo,*например*, генетически модифицированные клетки можно вводить вместе с CD8+ Т-клеткой; выживаемость генетически модифицированных клеток свидетельствует о способности избежать лизиса CD8+ Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления способы позволяют получить композицию, содержащую клетку, которая выживает in vivo в присутствии CD8+ Т-клеток в течение более 1, 2, 3, 4, 5 или 6 недель или более. В некоторых вариантах осуществления способы позволяют получить композицию, содержащую клетку, которая выживает in vivo в присутствии CD8+ Т-клеток в течение по меньшей мере от одной недели до шести недель. В некоторых вариантах осуществления способы позволяют получить композицию, содержащую клетку, которая выживает in vivo в присутствии CD8+ Т-клеток в течение по меньшей мере от двух недель до четырех недель. В некоторых вариантах осуществления способы позволяют получить композицию, содержащую клетку, которая выживает in vivo в присутствии CD8+ Т-клеток в течение по меньшей мере четырех-шести недель. В некоторых вариантах осуществления способы позволяют получить композицию, содержащую клетку, которая выживает in vivo в присутствии CD8+ Т-клеток в течение более шести недель.

[00195] В некоторых вариантах осуществления способы позволяют получить

композицию, содержащую клетку со сниженной или устраненной экспрессией MHC класса II и сниженной или устраненной экспрессией MHC класса I по сравнению с немодифицированной клеткой. В некоторых вариантах осуществления способы позволяют получить композицию, содержащую клетку со сниженной или устраненной экспрессией белка MHC класса II, сниженной или устраненной экспрессией белка CIITA и/или сниженным или устраненным уровнем CIITA в ядре клетки и/или устраненной или сниженной экспрессией белка MHC класса I. В некоторых вариантах осуществления способы позволяют получить композицию, содержащую клетку со сниженной или устраненной экспрессией белка MHC класса II, сниженной или устраненной экспрессией белка CIITA и/или сниженным или устраненным уровнем CIITA в ядре клетки и/или устраненной или сниженной экспрессией белка B2M. В некоторых вариантах осуществления способы позволяют получить композицию, содержащую клетку со сниженной или устраненной экспрессией белка MHC класса II, сниженной или устраненной экспрессией белка CIITA и/или сниженным или устраненным уровнем CIITA в ядре клетки и/или сниженными или устраненными уровнями мРНК B2M. В некоторых вариантах осуществления клетка вызывает сниженный или устраненный ответ CD8+ Т-клеток.

[00196] В некоторых вариантах осуществления способы позволяют получить композицию, содержащую клетку со сниженной или устраненной экспрессией MHC класса II и сниженной или устраненной экспрессией HLA-A по сравнению с немодифицированной клеткой, при этом клетка является гомозиготной по HLA-B и гомозиготной по HLA-C. В некоторых вариантах осуществления способы позволяют получить композицию, содержащую клетку со сниженной или устраненной экспрессией белка MHC класса II, сниженной или устраненной экспрессией белка CIITA и/или сниженным или устраненным уровнем CIITA в ядре клетки и/или устраненной или сниженной экспрессией белка HLA-A. В некоторых вариантах осуществления способы позволяют получить композицию, содержащую клетку со сниженной или устраненной экспрессией белка MHC класса II, сниженной или устраненной экспрессией белка CIITA и/или сниженным или устраненным уровнем CIITA в ядре клетки и/или устраненной или сниженной экспрессией белка HLA-A. В некоторых вариантах осуществления клетка вызывает сниженный или устраненный ответ CD8+ Т-клеток.

[00197] В некоторых вариантах осуществления предложена сконструированная клетка, в которой снижена или устранена экспрессия белка MHC класса II и MHC класса I на клеточной поверхности, при этом клетка содержит генетическую модификацию в CIITA, и при этом клетка содержит модификацию в B2M. В некоторых вариантах осуществления клетка вызывает сниженный ответ CD4+ Т-клеток и вызывает сниженный ответ CD8+ Т-клеток.

[00198] В некоторых вариантах осуществления предложена сконструированная клетка, в которой снижена или устранена экспрессия MHC класса II и белка HLA-A на клеточной поверхности, причем клетка содержит генетическую модификацию в CIITA, и

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

2. Экзогенные нуклеиновые кислоты

[00199] В некоторых вариантах осуществления в данном изобретении предложены способы и композиции для снижения или устранения экспрессии белка MHC класса II на поверхности клетки путем генетической модификации CIITA, как описано в данном документе, при этом способы и композиции дополнительно обеспечивают экспрессию экзогенной нуклеиновой кислоты сконструированной клеткой.

Нокин ингибитора NK-клеток

[00200] В некоторых вариантах осуществления в данном изобретении предложены способы снижения или устранения экспрессии белка MHC класса II на поверхности клетки путем генетической модификации CIITA, как описано в данном документе, при этом способы дополнительно обеспечивают экспрессию экзогенной нуклеиновой кислоты клеткой, при этом экзогенная нуклеиновая кислота кодирует молекулу ингибитора NK-клеток. В некоторых вариантах осуществления молекула ингибитора NK-клеток экспрессируется на поверхности клетки, что позволяет избежать активности NK-клеток (*например*, лизиса клетки NK-клеткой). В некоторых вариантах осуществления способность генетически модифицированной клетки избегать лизиса NK-клеток делает клетку восприимчивой к терапии на основе адоптивного переноса клеток. В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой аллогенную клетку.

[00201] В некоторых вариантах осуществления способы включают снижение или устранение экспрессии белка MHC класса II на поверхности клетки, включая генетическую модификацию CIITA, включающую приведение клетки в контакт с композицией, содержащей CIITA-направленную РНК, описанную в данном документе, при этом способ дополнительно включает приведение клетки в контакт с нуклеиновой кислотой, кодирующей молекулу ингибитора NK-клеток. В некоторых вариантах осуществления способы включают снижение или устранение экспрессии белка MHC класса II на поверхности клетки, включая модификацию CIITA, включающую приведение клетки в контакт с композицией, содержащей описанную CIITA-направленную РНК, при этом способ дополнительно включает приведение клетки в контакт с нуклеиновой кислотой, кодирующей молекулу ингибитора NK-клеток, и B2M-направленной РНК, тем самым снижая или устраняя экспрессию белка MHC класса I на поверхности клетки. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает приведение клетки в контакт с РНК-направляемым ДНК-связывающим агентом.

[00202] В некоторых вариантах осуществления способы включают снижение или устранение экспрессии белка MHC класса II на поверхности клетки, включая генетическую модификацию клетки с помощью одной или нескольких композиций, содержащих CIITA-направленную РНК, описанную в данном документе, B2M-направленную РНК, нуклеиновую кислоту, кодирующую молекулу ингибитора NK-клеток, и РНК-направляемый ДНК-связывающий агент или нуклеиновую кислоту, кодирующую РНК-направляемый ДНК-связывающий агент.

[00203] В некоторых вариантах осуществления способы включают индукцию DSB или SSB в CIITA, включая приведение в контакт клетки с композицией, содержащей CIITA-направленную РНК, описанную в данном документе, при этом способ дополнительно включает приведение в контакт клетки с нуклеиновой кислотой, кодирующей молекулу ингибитора NK-клеток. В некоторых вариантах осуществления способы включают индукцию DSB или SSB в CIITA, включая приведение в контакт клетки с композицией, содержащей CIITA-направленную РНК, описанную в данном документе, при этом способ дополнительно включает приведение в контакт клетки с нуклеиновой кислотой, кодирующей молекулу ингибитора NK-клеток, и B2M-направленной РНК, тем самым снижая экспрессию белка MHC класса I на поверхности клетки. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает приведение клетки в контакт с РНК-направляемым ДНК-связывающим агентом.

[00204] В некоторых вариантах осуществления способы включают снижение или устранение экспрессии белка CIITA в клетке, включая доставку композиции, содержащей CIITA-направленную РНК, описанную в данном документе, при этом способ дополнительно включает приведение клетки в контакт с нуклеиновой кислотой, кодирующей молекулу ингибитора NK-клеток. В некоторых вариантах осуществления способы включают снижение экспрессии белка CIITA в клетке, включая доставку композиции, содержащей CIITA-направленную РНК, описанную в данном документе, при этом способ дополнительно включает приведение клетки в контакт с нуклеиновой кислотой, кодирующей молекулу ингибитора NK-клеток, и B2M-направленной РНК, тем самым снижая экспрессию белка MHC класса I на поверхности клетки. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает приведение клетки в контакт с РНК-направляемым ДНК-связывающим агентом.

[00205] В некоторых вариантах осуществления молекула ингибитора NK-клетки связывается с ингибирующим рецептором на NK-клетке. В некоторых вариантах осуществления молекула ингибитора NK-клеток связывается с ингибирующим рецептором, специфичным для MHC класса I. В некоторых вариантах осуществления молекула ингибитора NK-клеток связывается с ингибирующим рецептором, который не является специфичным для MHC класса I. Рецепторы, ингибирующие NK-клетки, включают, *например*, KIR (человек), гетеродимер CD94-NKG2A (человека/мыши), Ly49 (мыши), 2B4, SLAMF6, NKFP-B, TIGIT, KIR2DL4.

[00206] В некоторых вариантах осуществления молекула ингибитора NK-клеток

связывается с NKG2A.

[00207] В некоторых вариантах осуществления молекула ингибитора NK-клеток представляет собой молекулу MHC класса I. В некоторых вариантах осуществления молекула ингибитора NK-клеток представляет собой классическую молекулу MHC класса I. В некоторых вариантах осуществления молекула ингибитора NK-клеток представляет собой неклассическую молекулу MHC класса I. В некоторых вариантах осуществления молекула ингибитора NK-клеток представляет собой молекулу HLA. Молекулы ингибиторов NK-клеток включают, *например*, HLA-C, HLA-E, HLA-G, Cd1, CD48, SLAMF6, Clr-b и CD155.

[00208] В некоторых вариантах осуществления молекула ингибитора NK-клеток представляет собой HLA-E.

[00209] В некоторых вариантах осуществления молекула ингибитора NK-клеток представляет собой слитый белок. В некоторых вариантах осуществления молекула ингибитора NK-клеток представляет собой слитый белок, содержащий HLA-E. В некоторых вариантах осуществления молекула ингибитора NK-клеток включает B2M. В некоторых вариантах осуществления молекула ингибитора NK-клеток включает HLA-E и B2M. В некоторых вариантах осуществления слитый белок включает линкер. В некоторых вариантах осуществления конструкция HLA-E представлена в виде вектора. В некоторых вариантах осуществления вектор, содержащий конструкцию HLA-E, представляет собой лентивирусный вектор. В некоторых вариантах осуществления конструкция HLA-E доставляется в клетку посредством лентивирусной трансдукции.

[00210] В некоторых вариантах осуществления молекула ингибитора NK-клеток вставлена в геном целевой клетки. В некоторых вариантах осуществления молекула ингибитора NK-клеток интегрирована в геном целевой клетки. В некоторых вариантах осуществления молекула ингибитора NK-клеток интегрирована в геном целевой клетки путем гомологичной рекомбинации (ГР). В некоторых вариантах осуществления молекула ингибитора NK-клеток интегрирована в геном целевой клетки путем вставки с тупым концом. В некоторых вариантах осуществления молекула ингибитора NK-клеток интегрирована в геном целевой клетки путем негомологичного соединения концов. В некоторых вариантах осуществления молекула ингибитора NK-клеток интегрирована в безопасный локус в геноме клетки. В некоторых вариантах осуществления молекула ингибитора NK-клеток интегрирована в один из локусов: локус TRAC, локус B2M, локус AAVS1 и/или локус CIITA. В некоторых вариантах осуществления молекула ингибитора NK-клеток вводится в клетку в составной композиции липида и нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления составная композиция липида и нуклеиновой кислоты представляет собой липидную наночастицу (LNP).

[00211] В некоторых вариантах осуществления способы позволяют получить сконструированную клетку, которая вызывает ослабленный ответ NK-клеток. Ответ NK-клеток можно оценить in vitro или in vivo. В некоторых вариантах осуществления активность NK-клеток можно оценить путем совместного культивирования генетически

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

[00212] В некоторых вариантах осуществления способы позволяют получить композицию, содержащую сконструированную клетку со сниженной или устраненной экспрессией MHC класса II и содержащую нуклеиновую кислоту, кодирующую молекулу ингибитора NK-клеток. В некоторых вариантах осуществления способы позволяют получить композицию, содержащую сконструированную клетку, в которой снижена или устранена экспрессия MHC класса II и экспрессия молекулы ингибитора NK-клеток на поверхности клетки. В некоторых вариантах осуществления способы позволяют получить композицию, содержащую клетку со сниженной или устраненной экспрессией MHC класса II и вызывающую сниженный ответ NK-клеток. В некоторых вариантах осуществления способы позволяют получить композицию, содержащую клетку со сниженной или устраненной экспрессией белка MHC класса II, сниженной или устраненной экспрессией белка CIITA и/или сниженным или устраненным уровнем CIITA в ядре клетки, и вызывающую сниженный ответ NK-клеток, и снижение или устранение экспрессии белка MHC класса I. В некоторых вариантах осуществления клетка вызывает ослабленный ответ CD4+ T-клеток, CD8+ T-клеток и/или NK-клеток.

[00213] В некоторых вариантах осуществления предложена аллогенная клетка, в которой снижена или устранена экспрессия белков MHC класса II и MHC класса I на клеточной поверхности, при этом клетка содержит модификацию в CIITA, как описано в данном документе, при этом клетка содержит генетическую модификацию в B2M, и при этом клетка содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую молекулу ингибитора NK-клеток. В некоторых вариантах осуществления аллогенная клетка вызывает сниженный ответ CD4+ T-клеток, CD8+ T-клеток и/или NK-клеток.

Нацеливающие рецепторы и другие полипептиды, экспрессируемые на клеточной

поверхности; секретируемые полипептиды

[00214] В некоторых вариантах осуществления в данном изобретении предложены способы снижения или устранения экспрессии белка MHC класса II на поверхности клетки путем генетической модификации CIITA, как описано в данном документе, при этом способы дополнительно обеспечивают экспрессию одной или нескольких экзогенных нуклеиновых кислот (*например*, антитело, химерный антигенный рецептор (CAR), Т-клеточный рецептор (TCR), цитокин или цитокиновый рецептор, хемокин или хемокиновый рецептор, фермент, слитый белок или другой тип связанного с клеточной поверхностью или растворимого полипептида). В некоторых вариантах осуществления экзогенная нуклеиновая кислота кодирует белок, который экспрессируется на поверхности клетки. Например, в некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения экзогенная нуклеиновая кислота кодирует нацеливающий рецептор, который экспрессируется на поверхности клетки (описанный далее в настоящем документе). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения генетически модифицированная клетка может функционировать как «клеточная фабрика» для экспрессии секретируемого полипептида, который кодируется экзогенной нуклеиновой кислотой, включая, *например*, источник для непрерывного производства полипептида in vivo (как описано далее в настоящем документе). В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой аллогенную клетку.

[00215] В некоторых вариантах осуществления способы включают снижение или устранение экспрессии белка MHC класса II на поверхности клетки, включая генетическую модификацию CIITA, включающую приведение клетки в контакт с композицией, содержащей CIITA-направленную РНК, как описано в данном документе, при этом способ дополнительно включает приведение клетки в контакт с экзогенной нуклеиновой кислотой. В некоторых вариантах осуществления способы включают снижение или устранение экспрессии белка MHC класса II на поверхности клетки, включая генетическую модификацию CIITA, включающую приведение клетки в контакт с композицией, содержащей CIITA-направленную РНК, как описано в данном документе, при этом способ дополнительно включает приведение клетки в контакт с экзогенной нуклеиновой кислотой и B2M-направленной РНК, тем самым снижая или устраняя экспрессию белка MHC класса I на поверхности клетки. В некоторых вариантах осуществления способы включают снижение или устранение экспрессии белка MHC класса II на поверхности клетки, включая генетическую модификацию гена CIITA, включающую приведение клетки в контакт с композицией, содержащей CIITA-направленную РНК, как описано в данном документе, при этом способ дополнительно включает приведение клетки в контакт с экзогенной нуклеиновой кислотой, экспрессируемым на поверхности клетки (например, нацеливающим рецептором) или растворимым (например, секретируемым) полипептидом и B2M-направленной РНК, тем самым снижая или устраняя экспрессию белка MHC класса I на поверхности клетки. В некоторых вариантах осуществления способы включают приведение клетки в контакт с

более чем одной экзогенной нуклеиновой кислотой. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает приведение клетки в контакт с РНК-направляемым ДНК-связывающим агентом.

[00216] В некоторых вариантах осуществления способы включают снижение или устранение экспрессии белка МНС класса II на поверхности клетки, включая генетическую модификацию CIITA, включающую приведение клетки в контакт с композицией, содержащей CIITA-направленную РНК, как описано в данном документе, при этом способ дополнительно включает приведение клетки в контакт с экзогенной нуклеиновой кислотой. В некоторых вариантах осуществления способы включают снижение или устранение экспрессии белка МНС класса II на поверхности клетки, включая генетическую модификацию CIITA, включающую приведение клетки в контакт с композицией, содержащей CIITA-направленную РНК, как описано в данном документе, при этом способ дополнительно включает приведение клетки в контакт с экзогенной нуклеиновой кислотой и HLA-A-направленной РНК, тем самым уменьшая или устраняя экспрессию белка HLA-A на поверхности клетки. В некоторых вариантах осуществления способы включают снижение или устранение экспрессии белка МНС класса II на поверхности клетки, включая генетическую модификацию гена CIITA, включающую приведение клетки в контакт с композицией, содержащей CIITA-направленную РНК, как описано в данном документе, при этом способ дополнительно включает приведение клетки в контакт с экзогенной нуклеиновой кислотой, экспрессируемым на поверхности клетки (например, нацеливающим рецептором) или растворимым (например, секретируемым) полипептидом и HLA-A-направленной РНК, тем самым снижая или устраняя экспрессию белка HLA-A на поверхности клетки. В некоторых вариантах осуществления способы включают приведение клетки в контакт с более чем одной экзогенной нуклеиновой кислотой. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает приведение клетки в контакт с РНК-направляемым ДНК-связывающим агентом.

[00217] В некоторых вариантах осуществления способы включают снижение или устранение экспрессии белка МНС класса II на поверхности клетки, включая генетическую модификацию клетки с помощью одной или нескольких композиций, содержащих CIITA-направленную РНК, как описано в данном документе, B2M-направленную РНК, экзогенную нуклеиновую кислоту, кодирующую молекулу ингибитора NK-клеток, экзогенную нуклеиновую кислоту, кодирующую полипептид (*например*, нацеливающий рецептор), и РНК-направляемый ДНК-связывающий агент или нуклеиновую кислоту, кодирующую РНК-направляемый ДНК-связывающий агент.

[00218] В некоторых вариантах осуществления способы включают снижение или устранение экспрессии белка МНС класса II и белка МНС класса I на поверхности клетки, включая генетическую модификацию клетки с помощью одной или нескольких композиций, содержащих CIITA-направленную РНК, как описано в данном документе, B2M-направленную РНК, экзогенную нуклеиновую кислоту, кодирующую молекулу

ингибитора NK-клеток, экзогенную нуклеиновую кислоту, кодирующую полипептид (*например*, нацеливающий рецептор), и РНК-направляемый ДНК-связывающий агент или нуклеиновую кислоту, кодирующую РНК-направляемый ДНК-связывающий агент.

[00219] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения способы включают снижение или устранение экспрессии белка MHC класса II и белка HLA-A на поверхности клетки, включающее генетическую модификацию клетки с помощью одной или большего количества композиций, содержащих CIITA-направляемую РНК, как описано в настоящем документе, B2M -направляемую РНК, экзогенную нуклеиновую кислоту, которая кодирует полипептид (*например*, нацеливающий рецептор) и РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, или нуклеиновую кислота, которая кодирует РНК-направляемый ДНК-связывающий агент.

[00220] В некоторых вариантах осуществления экзогенная нуклеиновая кислота кодирует полипептид, который экспрессируется на поверхности клетки. В некоторых вариантах осуществления экзогенная нуклеиновая кислота кодирует растворимый полипептид. В контексте настоящего документа термин «растворимый» полипептид относится к полипептиду, секретируемому клеткой. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения растворимый полипептид представляет собой терапевтический полипептид. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения растворимый полипептид представляет собой антитело. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения растворимый полипептид представляет собой фермент. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения растворимый полипептид представляет собой цитокин. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения растворимый полипептид представляет собой хемокин. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения растворимый полипептид представляет собой слитый белок.

[00221] В некоторых вариантах осуществления экзогенная нуклеиновая кислота кодирует антитело. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения экзогенная нуклеиновая кислота кодирует фрагмент антитела (*например*, Fab, Fab2). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения экзогенная нуклеиновая кислота кодирует полноразмерное антитело. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения экзогенная нуклеиновая кислота кодирует одноцепочечное антитело (*например*, scFv). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения антитело представляет собой IgG, IgM, IgD, IgA или IgE. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения антитело представляет собой антитело IgG. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой антитело IgG1. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения антитело представляет собой антитело IgG4. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения константная область тяжелой цепи содержит мутации, которые, как известно, снижают эффекторные функции. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения константная область тяжелой цепи содержит мутации, которые, как известно, усиливают

эффекторные функции. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения антитело представляет собой биспецифическое антитело. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения антитело представляет собой однодоменное антитело (*например*, антитело, содержащее только домен VH).

[00222] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения экзогенная нуклеиновая кислота кодирует нейтрализующее антитело. Нейтрализующее антитело нейтрализует активность антигена-мишени. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения антитело представляет собой нейтрализующее антитело против антигена вируса. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения антитело нейтрализует целевой вирусный антиген, блокируя способность вируса инфицировать клетку. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения для измерения нейтрализующей активности антитела можно применять клеточный анализ нейтрализации. Конкретные клетки и показания будут зависеть от целевого антигена нейтрализующего антитела. Полумаксимальная эффективная концентрация (EC_{50}) антитела может быть измерена в анализе нейтрализации на основе клеток, в которых более низкая EC_{50} свидетельствует о более сильнодействующем нейтрализующем антителе.

[00223] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения экзогенная нуклеиновая кислота кодирует антитело, которое связывается с антигеном, связанным с заболеванием или нарушением (*см.*, *например*, заболевания и нарушения, описанные в Разделе IV).

[00224] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения экзогенная нуклеиновая кислота кодирует полипептид, который экспрессируется на поверхности клетки (*т.е.* белок, связанный с поверхностью клетки). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения экзогенная нуклеиновая кислота кодирует нацеливающий рецептор. «Нацеленный рецептор» представляет собой рецептор, присутствующий на поверхности клетки, например, Т-клетки, для обеспечения связывания клетки с целевым участком, например, конкретной клеткой или тканью в организме. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения нацеливающий рецептор представляет собой CAR. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения нацеливающий рецептор представляет собой универсальный CAR (UniCAR). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения нацеливающий рецептор представляет собой TCR. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения нацеливающий рецептор представляет собой TRuC. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения нацеливающий рецептор представляет собой рецептор В-клеток (BCR) (например, экспрессированный на В-клетке). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения нацеливающий рецептор представляет собой хемокиновый рецептор. В некоторых вариантах осуществления нацеливающий рецептор представляет собой цитокиновый рецептор.

[00225] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения

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

[00226] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения экзогенная нуклеиновая кислота кодирует TCR. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения экзогенная нуклеиновая кислота кодирует генетически модифицированный TCR. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения экзогенная нуклеиновая кислота кодирует генетически модифицированный TCR со специфичностью в отношении полипептида, который экспрессируется раковыми клетками. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения экзогенная нуклеиновая кислота кодирует нацеливающий рецептор, специфичный к антигену гена опухоли Вильмса (WT1). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения экзогенная нуклеиновая кислота кодирует TCR, специфичная для WT1 (*см., например*, WO2020/081613A1).

[00227] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения экзогенная нуклеиновая кислота вставляется в геном целевой клетки. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения экзогенная нуклеиновая кислота интегрирована в геном целевой клетки. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения экзогенная нуклеиновая кислота интегрирована в геном целевой клетки путем гомологичной рекомбинации (HR). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения экзогенная нуклеиновая кислота интегрирована в геном целевой клетки путем вставки с тупым концом. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения экзогенная нуклеиновая кислота интегрирована в геном целевой клеткипутем

негомологичного соединения концов. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения экзогенная нуклеиновая кислота интегрирована в безопасный локус в геноме клетки. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения экзогенная нуклеиновая кислота интегрирована в один из локусов TRAC, локуса B2M, локуса AAVS1 и/или локуса CIITA. В некоторых вариантах осуществления экзогенная нуклеиновая кислота вводится в клетку в составной композиции липида и нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления составная композиция липида и нуклеиновой кислоты представляет собой липидную наночастицу (LNP).

[00228] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения способы позволяют получить композицию, содержащую сконструированную клетку со сниженной или устраненной экспрессией MHC класса II и содержащую экзогенную нуклеиновую кислоту. В некоторых вариантах осуществления способы позволяют получить композицию, содержащую сконструированную клетку со сниженной или устраненной экспрессией MHC класса II, которая секретирует и/или экспрессирует полипептид, который кодируется экзогенной нуклеиновой кислотой, интегрированной в геном клетки. В некоторых вариантах осуществления способы позволяют получить композицию, содержащую сконструированную клетку со сниженной или устраненной экспрессией белка MHC класса II, сниженной или устраненной экспрессией белка CIITA и/или сниженным или устраненным уровнем CIITA в ядре клетки, и вызывающую сниженный ответ со стороны NK-клеток, и имеющую сниженную экспрессию белка MHC класса I и секретирующую и/или экспрессирующую полипептид, кодируемый экзогенной нуклеиновой кислотой, интегрированной в геном клетки. В некоторых вариантах осуществления сконструированная клетка вызывает сниженный ответ CD4+ Т-клеток, CD8+ Т-клеток и/или NK-клеток.

[00229] В некоторых вариантах осуществления предложена аллогенная клетка, в которой снижена или устранена экспрессия белка MHC класса II и MHC класса I на клеточной поверхности, при это клетка содержит модификацию в CIITA, как описано в данном документе, при этом клетка содержит модификацию в B2M, при этом клетка содержит экзогенную нуклеиновую кислоту, кодирующую молекулу ингибитора NK-клеток, и при этом клетка дополнительно содержит экзогенную нуклеиновую кислоту, кодирующую полипептид (например, нацеливающий рецептор). В некоторых вариантах осуществления аллогенная клетка вызывает ослабленный ответ CD4+ Т-клеток, CD8+ Т-клеток и/или NK-клеток и дополнительно секретирует и/или экспрессирует терапевтический агент.

[00230] В вариантах осуществления предложена аллогенная клетка, в которой клетка имеет сниженную или устраненную экспрессию MHC класса II и белка HLA-A на клеточной поверхности, при этом клетка содержит модификацию CIITA, как описано в данном документе, при этом клетка содержит модификацию в гене HLA-A, при этом клетка дополнительно содержит экзогенную нуклеиновую кислоту, кодирующую полипептид (например, нацеливающий рецептор). В некоторых вариантах осуществления

аллогенная клетка вызывает ослабленный ответ CD4+ Т-клеток и/или CD8+ Т-клеток.

[00231] В некоторых вариантах осуществления в данном изобретении предложены способы снижения или устранения экспрессии белка МНС класса II на поверхности клетки путем генетической модификации CIITA, как описано в настоящем документе, при этом способы дополнительно обеспечивают снижение экспрессии одного или большего количества дополнительных целевых генов (*например*, TRAC, TRBC). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения дополнительные генетические модификации обеспечивают дополнительные преимущества применения генетически модифицированных клеток для адоптивного переноса клеток. В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой аллогенную клетку.

[00232] В некоторых вариантах осуществления способы включают снижение или устранение экспрессии белка МНС класса II на поверхности клетки, включая генетическую модификацию CIITA, включающую приведение в контакт клетки с композицией, содержащей CIITA-направленную РНК, как описано в данном документе, при этом способ дополнительно включает приведение в контакт клетки с направляющей РНК, которая направляет РНК-направляемый ДНК-связывающий агент к целевой последовательности, расположенной в другом гене (*например*, в гене, отличном от CIITA, или B2M, или HLA-A), тем самым снижая или устраняя экспрессию другого гена. В некоторых вариантах осуществления способы включают снижение экспрессии белка МНС класса II на поверхности клетки, включая генетическую модификацию CIITA, включающую приведение клетки в контакт с композицией, содержащей CIITA-направленную РНК, как описано в данном документе, при этом способ дополнительно включает приведение клетки в контакт с направляющей РНК, которая направляет РНК-направляемый ДНК-связывающий агент к целевой последовательности, расположенной в другом гене, и B2M-направленной РНК, тем самым снижая или устраняя экспрессию белка МНС класса I на поверхности клетки. В некоторых вариантах осуществления способы включают снижение или устранение экспрессии белка МНС класса II на поверхности клетки, включая генетическую модификацию CIITA, включающую приведение в контакт клетки с композицией, содержащей CIITA-направленную РНК, как описано в данном документе, при этом способ дополнительно включает приведение в контакт клетки с направляющей РНК, которая направляет РНК-направляемый ДНК-связывающий агент к целевой последовательности, расположенной в другом гене, тем самым снижая или устраняя экспрессию другого гена и экзогенной нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид (например, нацеливающий рецептор).

[00233] В некоторых вариантах осуществления способы включают снижение или устранение экспрессии белка МНС класса II на поверхности клетки, включая генетическую модификацию CIITA, включающую приведение в контакт клетки с композицией, содержащей CIITA-направленную РНК, как описано в данном документе, при этом способ дополнительно включает приведение в контакт клетки с направляющей РНК, которая направляет РНК-направляемый ДНК-связывающий агент к целевой

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

[00234] В некоторых вариантах осуществления способы включают снижение или устранение экспрессии белка MHC класса II на поверхности клетки, включая генетическую модификацию CIITA, включающую приведение в контакт клетки с композицией, содержащей CIITA-направленную РНК, как описано в данном документе, при этом способ дополнительно включает приведение в контакт клетки с направляющей РНК, которая направляет РНК-направляемый ДНК-связывающий агент к целевой последовательности, расположенной в другом гене, B2M-направленной РНК, тем самым снижая экспрессию белка MHC класса I на поверхности клетки, и экзогенной нуклеиновой кислоты, кодирующей ингибитор NK-клеток.

[00235] В некоторых вариантах осуществления способы включают снижение или устранение экспрессии белка MHC класса II на поверхности клетки, включая генетическую модификацию CIITA, включающую приведение клетки в контакт с композицией, содержащей CIITA-направленную РНК, как описано в данном документе, при этом способ дополнительно включает приведение клетки в контакт с направляющей РНК, которая направляет РНК-направляемый ДНК-связывающий агент к целевой последовательности, расположенной в другом гене, и HLA-A-направленной РНК, тем самым снижая экспрессию белка HLA-A на поверхности клетки.

[00236] В некоторых вариантах осуществления способы включают снижение или устранение экспрессии белка MHC класса II на поверхности клетки, включая генетическую модификацию CIITA, включающую приведение в контакт клетки с композицией, содержащей CIITA-направленную РНК, как описано в данном документе, при этом способ дополнительно включает приведение в контакт клетки с направляющей

РНК, которая направляет РНК-направляемый ДНК-связывающий агент к целевой последовательности, расположенной в другом гене, B2M-направленной РНК, тем самым снижая экспрессию белка MHC класса I на поверхности клетки, и экзогенной нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид (например, нацеливающий рецептор).

[00237] В некоторых вариантах осуществления способы включают снижение или устранение экспрессии белка MHC класса II на поверхности клетки, включая генетическую модификацию CIITA, включающую приведение в контакт клетки с композицией, содержащей CIITA-направленную РНК, как описано в данном документе, при этом способ дополнительно включает приведение в контакт клетки с направляющей РНК, которая направляет РНК-направляемый ДНК-связывающий агент к целевой последовательности, расположенной в другом гене, экзогенной нуклеиновой кислотой, кодирующей молекулу ингибитора NK-клеток, и экзогенной нуклеиновой кислотой, кодирующей полипептид (например, нацеливающий рецептор).

[00238] В некоторых вариантах осуществления способы включают снижение или устранение экспрессии белка MHC класса II на поверхности клетки, включая генетическую модификацию CIITA, включающую приведение клетки в контакт с композицией, содержащей CIITA-направленную РНК, как описано в данном документе, при этом способ дополнительно включает приведение клетки в контакт с направляющей РНК, которая направляет РНК-направляемый ДНК-связывающий агент к целевой последовательности, расположенной в другом гене, и HLA-A-направленной РНК, тем самым снижая экспрессию белка HLA-A на поверхности клетки и экзогенной нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид (например, нацеливающий рецептор).

[00239] В некоторых вариантах осуществления способы включают снижение или устранение экспрессии белка MHC класса II на поверхности клетки, включающее генетическую модификацию CIITA, включающую приведение в контакт клетки с композицией, содержащей CIITA-направленную РНК, как описано в настоящем документе, причем способ дополнительно включает приведение в контакт клетки с направляющей РНК, которая направляет РНК-направляемый ДНК-связывающий агент к последовательности-мишени, расположенной в другом гене, тем самым уменьшая или устраняя экспрессию дополнительного гена, B2M-направленной РНК, тем самым уменьшая или устраняя экспрессию белка MHC класса I на поверхности клетки, экзогенную нуклеиновую кислоту, кодирующую молекулу ингибитора NK-клеток, и экзогенную нуклеиновую кислоту, кодирующую полипептид (например, нацеливающий рецептор). В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает приведение клетки в контакт с РНК-направляемым ДНК-связывающим агентом.

[00240] В некоторых вариантах осуществления способы включают снижение или устранение экспрессии белка MHC класса II на поверхности клетки, включая генетическую модификацию клетки с помощью одной или более композиций, содержащих CIITA-направленную РНК, как описано в данном документе, B2M-направленную РНК, экзогенную нуклеиновую кислоту, кодирующую молекулу

ингибитора NK-клеток, экзогенную нуклеиновую кислоту, кодирующую полипептид (например, нацеливающий рецептор), направляющую РНК, которая направляет РНК-направляемый ДНК-связывающий агент к целевой последовательности, расположенной в другом гене, тем самым снижая или устраняя экспрессию другого гена и РНК-направляемого ДНК-связывающего агента или нуклеиновой кислоты, кодирующей РНК-направляемый ДНК-связывающий агент.

[00241] В некоторых вариантах осуществления способы включают снижение или устранение экспрессии белка MHC класса II на поверхности клетки, включая генетическую модификацию клетки с помощью одной или нескольких композиций, содержащих CIITA-направленную РНК, как описано в данном документе, HLA-A-направленную РНК, экзогенную нуклеиновую кислоту, кодирующую полипептид (например, нацеливающий рецептор), направляющую РНК, которая направляет РНК-направляемый ДНК-связывающий агент к целевой последовательности, расположенной в другом гене, тем самым снижая или устраняя экспрессию другого гена и РНК-направляемого ДНК-связывающего агента или нуклеиновой кислоты, кодирующей РНК-направляемый ДНК-связывающий агент.

[00242] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, дополнительный целевой ген представляет собой TRAC. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, дополнительный целевой ген представляет собой TRBC.

Типичные типы клеток

[00243] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения способы и композиции, описанные в настоящем документе, генетически модифицируют клетку. В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой аллогенную клетку. В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой клетку человека. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения генетически модифицированная клетка называется сконструированной клеткой. Сконструированная клетка относится к клетке (или потомству клетки), содержащей сконструированную генетическую модификацию, например, которая контактировала с системой редактирования генов и генетически модифицирована системой редактирования генов. Термины «сконструированная клетка» и «генетически модифицированная клетка» применяются взаимозаменяемо. Сконструированная клетка может представлять собой любой из типичных типов клеток, описанных в данном документе.

[00244] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения клетка представляет собой иммунную клетку. В контексте настоящего документа термин «иммунная клетка» относится к клетке иммунной системы, включая, например, лимфоцит (например, Т-клетку, В-клетку, естественную киллерную клетку («NK-клетку» и NKT-клетку или iNKT-клетку)), моноциты, макрофаги, тучные клетки, дендритные клетки или гранулоциты (например, нейтрофилы, эозинофилы и базофилы). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения клетка представляет собой первичную иммунную

клетку. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения клетка иммунной системы может быть выбрана из $CD3^+$, $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-клеток, регуляторных Т-клеток (Treg), В-клеток, NK-клеток и дендритных клеток (DC). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения иммунная клетка является аллогенной.

[00245] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения клетка представляет собой лимфоцит. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения клетка представляет собой адаптивную иммунную клетку. В некоторых вариантах осуществления указанная клетка представляет собой Т-клетку. В некоторых вариантах осуществления указанная клетка представляет собой В-клетку. В некоторых вариантах осуществления указанная клетка представляет собой NK-клетку. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения лимфоцит является аллогенным.

[00246] В контексте настоящего документа термин Т-клетка может быть определена как клетка, которая экспрессирует Т-клеточный рецептор («TCR» или «αβ TCR» или «γδ TCR»), однако в некоторых вариантах осуществления настоящего документа TCR Т-клетки может быть генетически модифицирован для снижения его экспрессии (*например*, путем генетической модификации генов TRAC или TRBC), поэтому экспрессию белка CD3 можно применять в качестве маркера для идентификации Т-клетки согласно стандартным методам проточной цитометрии. CD3 представляет собой многосубъединичный сигнальный комплекс, связанный с TCR. Таким образом, Т-клетка может быть названа как CD3+. В некоторых вариантах осуществления настоящего документа Т-клетка представляет собой клетку, которая экспрессирует маркер CD3+ и либо маркер CD4+, либо маркер CD8+. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения Т-клетка является аллогенной.

[00247] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения Т-клетка экспрессирует гликопротеин CD8 и, таким образом, CD8+ согласно стандартным методам проточной цитометрии может называться «цитотоксичной» Т-клеткой. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения Т-клетка экспрессирует гликопротеин CD4 и, таким образом, CD4+ согласно стандартным методам проточной цитометрии может называться «хелперной» Т-клеткой. CD4+ Т-клетки могут дифференцироваться в подмножества и могут называться Th1 клетками, Th2 клетками, Th9 клетками, Th17 клетками, Th22 клетками, Т-регуляторными («Treg») клетками или Т-фолликулярными хелперными клетками («Tfh»). Каждое подмножество CD4+ выделяет специфические цитокины, которые могут иметь либо провоспалительные, либо противовоспалительные функции, функции выживания или защитные функции. Т-клетка может быть выделена из субъекта методами селекции CD4+ или CD8+.

[00248] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения Т-клетка представляет собой Т-клетку памяти. В организме Т-клетка памяти столкнулась с антигеном. Т-клетки памяти могут располагаться во вторичных лимфоидных органах (центральные Т-клетки памяти) или в недавно инфицированной ткани (эффекторные Т-клетки памяти). Т-клеткой памяти может быть CD8+ Т-клетка. Т-клеткой памяти может

быть CD4+ Т-клетка.

[00249] В контексте настоящего документа термин «центральная Т-клетка памяти» может называтся как Т-клетка, контактирующая с антигеном, и, например, может экспрессировать CD62L и CD45RO. Центральная Т-клетки памяти могут быть обнаружены как CD62L+ и CD45RO+ Центральными Т-клетками памяти, которые также экспрессируют CCR7, поэтому могут быть обнаружены CCR7+ согласно стандартным методам проточной цитометрии.

[00250] В контексте настоящего документа термин «ранняя Т-клетка памяти стволовых клеток» (или «Tscm») может называтся как Т-клетка, которая экспрессирует CD27 и CD45RA и, следовательно, представляет собой CD27+ и CD45RA+ согласно стандартным методам проточной цитометрии. Tscm не экспрессирует изоформу CD45 CD45RO, поэтому Tscm далее будет CD45RO- при окрашивании на эту изоформу согласно стандартным способам проточной цитометрии. Следовательно, клетка CD45RO-CD27+ также представляет собой раннюю Т-клетку памяти стволовых клеток. Клетки Tscm дополнительно экспрессируют CD62L и CCR7, поэтому могут быть обнаружены как CD62L+ и CCR7+ согласно стандартным способам проточной цитометрии. Было продемонстрировано, что ранние Т-клетки памяти стволовых клеток коррелируют с повышенной стойкостью и терапевтической эффективностью продуктов клеточной терапии.

[00251] В некоторых вариантах осуществления указанная клетка представляет собой В-клетку. В контексте настоящего документа термин «В-клетка» может быть определен как клетка, которая экспрессирует CD19 и/или CD20, и/или зрелый антиген В-клетки («BCMA»), и, следовательно, В-клетка представляет собой CD19+ и/или CD20+, и /или BCMA+ согласно стандартным способам проточной цитометрии. Кроме того, В-клетка является отрицательной в отношении CD3 и CD56 согласно стандартным способам проточной цитометрии. В-клетка может быть плазматической клеткой. В-клетка может быть В-клеткой памяти. В-клетка может быть наивной В-клеткой. В-клетка может быть IgM+ или иметь В-клеточный рецептор с переключением класса (*например*, IgG+ или IgA+). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения В-клетка является аллогенной.

[00252] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения клетка представляет собой мононуклеарную клетку, например, из костного мозга или периферической крови. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения клетка представляет собой мононуклеарную клетку периферической крови («PBMC»). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения клетка представляет собой PBMC, *например* лимфоцит или моноцит. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения клетка представляет собой лимфоцит периферической крови («PBL»). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения мононуклеарная клетка является аллогенной.

[00253] Включены клетки, применяемые в терапии на основе АПК и/или

регенеративной терапии тканей, такие как стволовые клетки, клетки-предшественники и первичные клетки. Стволовые клетки, например, включают плюрипотентные стволовые клетки (PSC); индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (iPSC); эмбриональные стволовые клетки (ESC); мезенхимальные стволовые клетки (MSC, *например*, выделенные из костного мозга (BM), периферической крови (PB), плаценты, пуповины (UC) или жировой ткани); гемопоэтические стволовые клетки (ГСК; *например*, выделенные из BM или UC); нейральные стволовые клетки (NSC); тканеспецифические стволовые клетки-предшественники (TSPSC); и лимбальные стволовые клетки (LSCs). Прогениторные и первичные клетки включают мононуклеарные клетки (MNC, *например*, выделенные из BM или PB); эндотелиальные клетки-предшественники (EPC, *например*, выделенные из BM, PB и UC); нейральные клетки-предшественники (NPC); и тканеспецифические первичные клетки или полученные из них клетки (TSC), включая хондроциты, миоциты и кератиноциты. Также включены клетки для трансплантации органов или тканей, такие как островковые клетки, кардиомиоциты, клетки щитовидной железы, тимоциты, нейрональные клетки, клетки кожи и клетки сетчатки.

[00254] В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой клетку человека, такую как клетка, выделенная от человека. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения клетки выделяют из PBMC или лейкопаков донора человека. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения клетка получена от субъекта с состоянием, нарушением или заболеванием. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения клетка получена от донора человека с вирусом Эпштейна-Барр («EBV»).

[00255] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения способы осуществляются ex vivo. В контексте настоящего документа термин «ex vivo» относится к методу in vitro, при котором клетка может быть перенесена субъекту, *например*, в качестве терапии на основе АПК. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения метод ex vivo представляет собой метод in vitro, включающий клетки или клеточную популяцию для терапии на основе АПК.

[00256] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения клетка происходит из клеточной линии. В некоторых вариантах осуществления клеточная линия получена от человека. В некоторых вариантах осуществления клеточная линия представляет собой лимфобластоидную клеточную линию («LCL»). Клетка может быть криоконсервирована и разморожена. Клетка, возможно, ранее не подвергалась криоконсервации.

[00257] В некоторых вариантах осуществления клетка получена из банка клеток. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения клетку генетически модифицируют, а затем переносят в банк клеток. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения клетка удаляется у субъекта, генетически модифицируется ex vivo и переносится в банк клеток. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения генетически модифицированную популяцию клеток переносят в банк клеток.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения генетически модифицированную популяцию иммунных клеток переносят в банк клеток. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения в банк клеток переносят генетически модифицированную популяцию иммунных клеток, включающую первую и вторую субпопуляции, где первая и вторая субпопуляции имеют по меньшей мере одну общую генетическую модификацию и по меньшей мере одну отличающуюся генетическую модификацию.

[00258] В некоторых вариантах осуществления, когда клетка является гомозиготной по HLA-B, аллель HLA-B выбран из любого из следующих аллелей HLA-B: HLA-B*07:02; HLA-B*08:01; HLA-B*44:02; HLA-B*35:01; HLA-B*40:01; HLA-B*57:01; HLA-B*14:02; HLA-B*15:01; HLA-B*13:02; HLA-B*44:03; HLA-B*38:01; HLA-B*18:01; HLA-B*44:03; HLA-B*51:01; HLA-B*49:01; HLA-B*15:01; HLA-B*18:01; HLA-B*27:05; HLA-B*35:03; HLA-B*18:01; HLA-B*52:01; HLA-B*51:01; HLA-B*37:01; HLA-B*53:01; HLA-B*55:01; HLA-B*44:02; HLA-B*44:03; HLA-B*35:02; HLA-B*15:01 и HLA-B*40:02.

[00259] В некоторых вариантах осуществления, когда клетка является гомозиготной по HLA-C, аллель HLA-C выбран из любого из следующих аллелей HLA-C: HLA-C*07:02; HLA-C*07:01; HLA-C*05:01; HLA-C*04:01 HLA-C*03:04; HLA-C*06:02; HLA-C*08:02; HLA-C*03:03; HLA-C*06:02; HLA-C*16:01; HLA-C*12:03; HLA-C*07:01; HLA-C*04:01; HLA-C*15:02; HLA-C*07:01; HLA-C*03:04; HLA-C*12:03; HLA-C*02:02; HLA-C*04:01; HLA-C*05:01; HLA-C*12:02; HLA-C*14:02; HLA-C*06:02; HLA-C*04:01; HLA-C*03:03; HLA-C*07:04; HLA-C*07:01; HLA-C*04:01; HLA-C*04:01 и HLA-C*02:02.

[00260] В некоторых вариантах осуществления клетка является гомозиготной по HLA-B и гомозиготной по HLA-C, и аллель HLA-B выбран из любого из следующих аллелей HLA-B: HLA-B*07:02; HLA-B*08:01; HLA-B*44:02; HLA-B*35:01; HLA-B*40:01; HLA-B*57:01; HLA-B*14:02; HLA-B*15:01; HLA-B*13:02; HLA-B*44:03; HLA-B*38:01; HLA-B*18:01; HLA-B*44:03; HLA-B*51:01; HLA-B*49:01; HLA-B*15:01; HLA-B*18:01; HLA-B*27:05; HLA-B*35:03; HLA-B*18:01; HLA-B*52:01; HLA-B*51:01; HLA-B*37:01; HLA-B*53:01; HLA-B*55:01; HLA-B*44:02; HLA-B*44:03; HLA-B*35:02; HLA-B*15:01 и HLA-B*40:02; и аллель HLA-C выбран из любого из следующих аллелей HLA-C: HLA-C*07:02; HLA-C*07:01; HLA-C*05:01; HLA-C*04:01 HLA-C*03:04; HLA-C*06:02; HLA-C*08:02; HLA-C*03:03; HLA-C*06:02; HLA-C*16:01; HLA-C*12:03; HLA-C*07:01; HLA-C*04:01; HLA-C*15:02; HLA-C*07:01; HLA-C*03:04; HLA-C*12:03; HLA-C*02:02; HLA-C*04:01; HLA-C*05:01; HLA-C*12:02; HLA-C*14:02; HLA-C*06:02; HLA-C*04:01; HLA-C*03:03; HLA-C*07:04; HLA-C*07:01; HLA-C*04:01; HLA-C*04:01 и HLA-C*02:02.

[00261] В некоторых вариантах осуществления клетка является гомозиготной по HLA-B и гомозиготной по HLA-C, и аллели HLA-B и HLA-C выбраны из любого из следующих аллелей HLA-B и HLA-C: HLA-B*07:02 и HLA-C*07:02; HLA-B*08:01 и HLA-C*07:01; HLA-B*44:02 и HLA-C*05:01; HLA-B*35:01 и HLA-C*04:01; HLA-B*40:01 и HLA-C*03:04; HLA-B*57:01 и HLA-C*06:02; HLA-B*14:02 и HLA-C*08:02; HLA-B*15:01 и HLA-C*03:03; HLA-B*13:02 и HLA-C*06:02; HLA-B*44:03 и HLA-C*16:01; HLA-

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

Подробное описание систем редактирования генов

[00262] Для создания описанных в данном документе сконструированных клеток можно применять различные подходящие системы редактирования генов, включая, но не ограничиваясь этим, систему CRISPR/Cas; система нуклеаз цинковых пальцев (ZFN); и система эффекторных нуклеаз, подобная активатору транскрипции (TALEN). Как правило, системы редактирования генов включают применение сконструированных систем расщепления для индуцирования двухцепочечного разрыва (DSB) или разрыва (например, одноцепочечного разрыва или SSB) в целевой последовательности ДНК. Расщепление или разрыв может происходить с помощью специфических нуклеаз, таких как сконструированные ZFN, TALEN, или с применением системы CRISPR/Cas со сконструированной РНК-направляемой для управления специфическим расщеплением или разрыв целевой последовательности ДНК. Кроме того, на основе системы Argonaute разрабатываются адресные нуклеазы (например, из T. thermophilus, известного как «TtAgo», см. Swarts et al (2014) Nature 507(7491): 258-261), которые также могут иметь потенциал для применения в редактировании генов и генной терапии.

[00263] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения система редактирования генов представляет собой систему TALEN. Эффекторные нуклеазы, подобные активаторам транскрипции (TALEN), представляют собой рестрикционные ферменты, которые можно сконструировать для разрезания определенных последовательностей ДНК. Их получают путем слияния эффекторного ДНК-связывающего домена TAL с доменом расщепления ДНК (нуклеаза, которая разрезает нити ДНК). Эффекторы, подобные активаторам транскрипции (TALEs), могут быть сконструированы для связывания с желаемой последовательностью ДНК, чтобы способствовать расщеплению ДНК в определенных местах (см., например, Boch, 2011,

Nature Biotech). Ферменты рестрикции могут быть введены в клетки для применения при редактировании генов или для редактирования генов in situ, метод, известный как редактирование генов с помощью инженерных нуклеаз. Такие способы и композиции для их применения известны в данной области техники. См., например, WO2019147805, WO2014040370, WO2018073393, содержание которых включено в настоящий документ посредством ссылки.

[00264] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения система редактирования генов представляет собой систему цинковых пальцев. Нуклеазы «цинковые пальцы» (ZFN) представляют собой искусственные рестрикционные ферменты, генерируемые путем слияния ДНК-связывающего домена «цинковые пальцы» с доменом расщепления ДНК. Домены цинковых пальцев могут быть сконструированы для нацеливания на определенные желаемые последовательности ДНК, чтобы позволить нуклеазам цинковых пальцев нацеливаться на уникальные последовательности в комплексных геномах. Домен неспецифического расщепления эндонуклеазы рестрикции II типа FokI обычно применяется в качестве домена расщепления в ZFN. Расщепление восстанавливается с помощью эндогенного механизма репарации ДНК, что позволяет ZFN точно изменять геномы высших организмов. Такие способы и композиции для их применения известны в данной области техники. См., например, WO2011091324, содержание которой включено настоящий документ посредством ссылки.

[00265] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения система редактирования генов представляет собой систему CRISPR/Cas, включающую, например, РНК-направляемую CRISPR, содержащую направляющую последовательность и РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, и дополнительно описана в настоящем документе.

Направляющая РНК CRISPR

[00266] В настоящем документе представлены направляющие последовательности, применимые для модификации целевые последовательности, *например*, с применением, содержащей описанную направляющую последовательность, с РНК-направляемой ДНК-связывающим агентом (*например*, системой CRISPR/Cas).

[00267] Каждая из описанных в данном документе направляющих последовательностей может дополнительно содержать дополнительные нуклеотиды для образования crРНК, например, со следующей типовой последовательностью нуклеотидов, следующей за направляющей последовательностью на ее 3'-конце: GUUUUAGAGCUAUGCUGUUUUG (SEQ ID NO: 170) в ориентации от 5’ к 3’. В случае онРНК вышеуказанные направляющие последовательности могут дополнительно содержать дополнительные нуклеотиды (каркасная последовательность) для образования онРНК, например, со следующей иллюстративной последовательностью нуклеотидов, следующей за 3'-концом направляющей последовательности: GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGA AAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU (SEQ ID NO: 171) или

GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGA AAAAGUGGCACCGAGUCGGUGC (SEQ ID NO: 172, которая представляет собой SEQ ID NO: 171 без четырех концевых U) в ориентации от 5’ к 3’. В некоторых вариантах осуществления четыре концевых U из SEQ ID NO: 171 отсутствуют. В некоторых вариантах осуществления только 1, 2 или 3 из четырех концевых U последовательности SEQ ID NO: 171 присутствуют.

[00268] В некоторых вариантах осуществления онРНК содержит любую из направляющих последовательностей SEQ ID NO: 1-117 и дополнительные нуклеотиды для образования crРНК, например, со следующей типовой последовательностью нуклеотидов, следующей за направляющей последовательностью на ее 3'-конце: GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGG CACCGAGUCGGUGC (SEQ ID NO: 173) в ориентации от 5’ к 3’. SEQ ID NO: 173 отсутствуют 8 нуклеотидов со ссылкой на консервативную последовательность РНК-направляемой дикого типа: GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGA AAAAGUGGCACCGAGUCGGUGC (SEQ ID NO: 172). Другие иллюстративные каркасные нуклеотидные последовательности представлены в Таблице 4. В некоторых вариантах осуществления онРНК содержит любую из направляющих последовательностей SEQ ID NO: 1-117 и дополнительные направляющие каркасные последовательности с 5’-3’-ориентацией в Таблице 4 включая модифицированные версии последовательностей каркаса, как продемонстрировано.

[00269] В некоторых вариантах осуществления направляющая РНК представляет собой онРНК, содержащую любую из последовательностей, показанных в таблице 2 (SEQ ID NO: 218-334 и 335-426). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения РНК-направляемая представляет собой химически модифицированную РНК-направляемую. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения РНК-направляемая представляет собой химически модифицированную одиночную РНК-направляемую. Химически модифицированные РНК-направляемые могут содержать одну или большее количество модификаций, как продемонстрировано в Таблице 2. Химически модифицированные РНК-направляемые могут содержать один или большее количество модифицированных нуклеотидов любой из SEQ ID NO: 1006, 1010-1012 и 1014-1017.

[00270] В некоторых вариантах осуществления направляющая РНК представляет собой онРНК, содержащую любую из SEQ ID NO: 218-334, с по крайней мере одной химической модификацией, описанной в данном документе. В некоторых вариантах осуществления направляющая РНК представляет собой онРНК, содержащую последовательность, которая на по меньшей мере 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91% или 90% идентична любой одной из SEQ ID NO: 218-334, с по крайней мере одной химической модификацией, описанной в данном документе.

[00271] В некоторых вариантах осуществления направляющая РНК представляет собой онРНК, содержащую паттерн модификации, показанный в SEQ ID NO: 1016 или

1017. В некоторых вариантах осуществления направляющая РНК представляет собой онРНК, содержащую последовательность, которая по меньшей мере на 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91% или 90% идентична любой из нуклеиновых кислот SEQ ID NO: 335-426.

[00272] В некоторых вариантах осуществления направляющая РНК содержит онРНК, содержащую паттерн модификации, показанный в SEQ ID NO: 1006. В некоторых вариантах осуществления направляющая РНК содержит онРНК, содержащую модифицированные нуклеотиды SEQ ID NO: 1006, включая направляющую последовательность, содержащую последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1-117. В некоторых вариантах осуществления направляющая РНК представляет собой онРНК, содержащую последовательность SEQ ID NO: 1008 или последовательность, которая на по меньшей мере 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91% или 90% идентична SEQ ID NO: 1008.

[00273] В некоторых вариантах осуществления направляющая РНК представляет собой одиночную направляющую РНК, содержащую любую из последовательностей SEQ ID NO: 335-426 и 1008, или последовательность, которая на по меньшей мере 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91% или 90% идентична любой из последовательностей SEQ ID NO: 335-426 и 1008. В некоторых вариантах осуществления направляющая РНК представляет собой одиночную направляющую РНК, содержащую любую из последовательностей SEQ ID NO: 32, 64, 67, 68, 74, 76, 84, 86, 90, 91 и 115.

В некоторых вариантах осуществления направляющая РНК представляет собой одну направляющую РНК, содержащую любую из последовательностей SEQ ID NO: 341, 373, 376, 377, 383, 385, 393, 395, 399, 400 и 424, или последовательность, которая на по меньшей мере 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91% или 90% идентична любой из последовательностей SEQ ID NO: 341, 373, 376, 377, 383, 385, 393, 395, 399, 400 и 424.

[00274] РНК-направляемая может дополнительно содержать trРНК. В каждом воплощении композиции и способа, описанных в настоящем документе, crРНК и trРНК могут быть связаны как одиночная РНК (онРНК) , или могут находиться на отдельных РНК (днРНК). В контексте онРНК компоненты crРНК и trРНК могут быть ковалентно связаны, например, посредством фосфодиэфирной связи или другой ковалентной связи. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения последовательность crРНК и/или trРНК может называться «каркасом» или «консервативной частью» направляющей РНК.

[00275] В каждом из вариантов осуществления настоящего изобретения композиции, применения и способа, описанных в настоящем документе, направляющая РНК может содержать две молекулы РНК в качестве «двойной направляющей РНК» или «днРНК». днРНК содержит первую молекулу РНК, содержащую crРНК, содержащую, *например*, направляющую последовательность, показанную в **Таблице 2**, и вторую молекулу РНК, содержащую trРНК. Молекулы первой и второй РНК могут не быть

ковалентно связаны, но могут образовывать дуплекс РНК за счет спаривания оснований между частями crРНК и trРНК.

[00276] В каждом из вариантов композиции, применений и способа, описанных в настоящем документе, направляющая РНК может содержать одну молекулу РНК в качестве «одиночной направляющей РНК» или «онРНК». онРНК может содержать crРНК (или ее часть), содержащую направляющую последовательность, показанную в **Таблице 2**, ковалентно связанную с trРНК. онРНК может содержать 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов направляющей последовательности, показанной в **Таблице 2**. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения crРНК и trРНК ковалентно связаны через линкер. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения онРНК образует стержне-петлевую структуру за счет спаривания оснований между частями crРНК и trРНК. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения crРНК и trРНК ковалентно связаны посредством одной или большего количества связей, которые не являются фосфодиэфирной связью.

[00277] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения trРНК может содержать всю или часть последовательности trРНК, полученной из природной системы CRISPR/Cas. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения trРНК содержит укороченную или модифицированную trРНК дикого типа. Длина trРНК зависит от применяемой системы CRISPR/Cas. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения trРНК содержит или состоит из 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 или более 100 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения trРНК может содержать определенные вторичные структуры, такие как, например, одну или большее количество структур шпильки или стержне-петлевой, или одну или большее количество структур выпуклости.

[00278] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предлагается композиция, содержащая одну или большее количество направляющих РНК, содержащих направляющую последовательность, любую из предложенных в **Таблице 2**. В некоторых вариантах осуществления предложена композиция, содержащая одну или более направляющих РНК, содержащих направляющую последовательность, любую из приведенных в **Таблице 2**, в которой нуклеотиды SEQ ID NO: 170, 171, 172 или 173 расположены за направляющей последовательностью на ее 3'-конце. В некоторых вариантах осуществления одна или более направляющих РНК содержат направляющую последовательность, любую из приведенных в **Таблице 2**, в которой нуклеотиды SEQ ID NO: 170, 171, 172 или 173 расположенные за направляющей последовательностью на ее 3'-конце, модифицированы в соответствии с паттерном модификации любой из SEQ ID NO: 1006, 1010-1012 и 1014-1017.

[00279] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предлагается композиция, содержащая одну или большее количество направляющих РНК, содержащих направляющую последовательность, любую из предложенных в **Таблице 2**. В одном аспекте предложена композиция, содержащая одну или более нРНК, содержащая

направляющую последовательность, на по меньшей мере 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91% или 90% идентичную любой из нуклеиновых кислот SEQ ID NO: 1-117.

[00280] В других вариантах осуществления настоящего изобретения предлагается композиция, которая содержит по меньшей мере одну, например, по меньшей мере две нРНК, содержащие направляющие последовательности, выбранные из любых двух или большего количества направляющих последовательностей, продемонстрированных в **Таблице 2**. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения композиция содержит по меньшей мере две нРНК, каждая из которых содержит направляющую последовательность, идентичную по меньшей мере на 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91% или 90% любой из направляющих последовательностей, продемонстрированных в **Таблице 2**.

[00281] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения композиции направляющей РНК по настоящему изобретению предназначены для распознавания (*например*, гибридизации) целевой последовательности в CIITA. Например, целевая последовательность CIITA может распознаваться и расщепляться предложенной клевазой Cas, содержащей направляющую РНК. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, такой как клеаваза Cas, может направляться направляющей РНК к целевой последовательности в CIITA, где направляющая последовательность направляющей РНК гибридизуется с целевой последовательностью и РНК-направляемым ДНК-связывающим агентом, таким как клеваза Cas, который расщепляет целевую последовательность.

[00282] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения выбор одной или более направляющей РНК определяется на основе целевых последовательностей в CIITA. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения композиции, содержащие одну или большее количество направляющих последовательностей, содержат направляющую последовательность, комплементарную соответствующей геномной области, продемонстрированной в **Таблице 2**, в соответствии с координатами из эталонного генома человека hg38. Направляющие последовательности дополнительных вариантов осуществления могут быть комплементарны последовательностям в непосредственной близости геномных координат, указанных в **Таблице 2** в пределах CIITA. Например, направляющие последовательности дополнительных вариантов осуществления настоящего изобретения могут быть комплементарны последовательностям, которые содержат 10 смежных нуклеотидов ± 10 нуклеотидов геномных координат, указанных в **Таблице 2**.

[00283] Не ограничиваясь какой-либо конкретной теорией, модификацией (например, мутации со сдвигом рамки считывания, возникающие в результате вставок, возникающих в результате опосредованного нуклеазой DSB) в определенных областях целевого гена могут быть менее переносимыми, чем мутации в других областях, таким образом, расположение DSB является важным фактором в количестве или типе нокдауна белка, который может возникнуть. В некоторых вариантах осуществления настоящего

изобретения нРНК, комплементарная или имеющая комплементарность к целевой последовательности в целевом гене, используется для направления РНК-направляемого ДНК-связывающего агента в конкретное место в целевой гене.

[00284] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения направляющая последовательность по меньшей мере на 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91%, 90%, 85% или 80% идентична целевой последовательности, присутствующей в целевом гене. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения направляющая последовательность по меньшей мере на 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91%, 90%, 85% или 80% идентична целевой последовательности, присутствующей в гене CIITA человека.

[00285] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения целевая последовательность может быть комплементарной направляющей последовательности направляющей РНК. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения степень комплементарности или идентичности между направляющей последовательностью направляющей РНК и соответствующей целевой последовательностью может составлять по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, или 100%. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения целевая последовательность и направляющая последовательность нРНК могут быть на 100% комплементарными или идентичными. В других вариантах осуществления настоящего изобретения целевая последовательность и направляющая последовательность нРНК могут содержать по меньшей мере одно несовпадение. Например, целевая последовательность и направляющая последовательность нРНК могут содержать 1, 2, 3 или 4 несовпадения, при этом общая длина направляющей последовательности составляет 20. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения целевая последовательность и направляющая последовательность нРНК могут содержать 1-4 несовпадения, где направляющая последовательность составляет 20 нуклеотидов.

[00286] В некоторых вариантах осуществления композиция или состав, описанные в данном документе, содержат мРНК, содержащую открытую рамку считывания (ORF), кодирующую РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, такой как нуклеаза Cas, как описано в данном документе. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предлагается, применяется или вводится мРНК, содержащая ORF, кодирующая РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, такой как Cas нуклеаза.

Модификации нРНК

[00287] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения нРНК (например, онРНК, короткая онРНК, днРНК или сгРНК) модифицирована. Термин «модифицированный» или «модификация» в контексте нРНК, описанной в настоящем документе, включает модификации, описанные выше, в том числе, например, (a) концевые модификации, например, 5'-концевые модификации или 3'-концевые модификации, включая 5'-концевые модификации. или модификации 3'-защитного конца, (b)

модификации нуклеиновых оснований (или «оснований»), включая замену или удаление оснований, (c) модификации сахаров, включая модификации в положениях 2', 3' и/или 4', (d) модификации межнуклеозидных связей и (e) модификации основной цепи, которые могут включать модификацию или замену фосфодиэфирных связей и/или сахара рибозы. Модификация нуклеотида в данном положении включает модификацию или замену фосфодиэфирной связи непосредственно у 3'-конца сахара нуклеотида. Так, например, считается, что нуклеиновая кислота, содержащая фосфоротиоат между первым и вторым сахарами с 5'-конца, содержит модификацию в положении 1. Термин «модифицированная нРНК» обычно относится к нРНК, имеющей модификацию химической структуры одного или большего количества из следующих элементов: основание, сахар и фосфодиэфирная связь или часть остова, включая нуклеотидфосфаты, как подробно описано и проиллюстрировано в настоящем документе.

[00288] Дальнейшее описание и примеры модификаций предложены в Таблице 1 документа WO2019/237069, опубликованного 12 декабря 2019 г., полное содержание которого включено в настоящий документ в качестве ссылки.

[00289] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения нРНК содержит модификации в 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 или большего количества YA-сайтов. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения пиримидин YA-сайта содержит модификацию (которая включает модификацию, изменяющую межнуклеозидную связь непосредственно с 3’-конца сахара пиримидина). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения аденин YA-сайта содержит модификацию (которая включает модификацию, изменяющую межнуклеозидную связь непосредственно с 3’-конца сахара аденина). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения пиримидин и аденин YA-сайта содержат модификации, такие как модификации сахара, основания или межнуклеозидной связи. YA-модификации могут представлять собой модификации любого из типов, приведенных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения YA-модификации содержат один или большее количество из фосфоротиоата, 2’-OMe или 2’-фтор. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения YA-модификации включают модификации пиримидина, включающие один или большее количество из фосфоротиоата, 2’-OMe, 2’-H, инозина или 2’-фтора. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения YA-модификация содержит бициклический аналог рибозы (например, LNA, BNA или ENA) в области дуплекса РНК, которая содержит один или большее количество YA-сайтов. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения YA-модификация содержит аналог бициклической рибозы (например, LNA, BNA или ENA) в области дуплекса РНК, которая содержит YA-сайт, где YA-модификация расположена дистальнее YA-сайта.

[00290] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения направляющая последовательность (или направляющая область) нРНК содержит 1, 2, 3, 4, 5 или большее количество YA-сайтов («YA-сайты направляющей области»), которые

могут содержать YA-модификации. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения один или большее количество YA-сайтов, расположенных на 5-конце, 6-конце, 7-конце, 8-конце, 9-конце или 10-конце от 5'-конца 5'-конца (где «5-конец» и т. д., относится к положению 5 к 3'-концу направляющей области, т. е. самому 3'-нуклеотиду в направляющей области) содержат YA-модификации. Модифицированный YA-сайт направляющей области содержит YA-модификацию.

[00291] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения YA-сайт модифицированной направляющей области находится в пределах 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10 или 9 нуклеотидов от 3'-концевого нуклеотида направляющей области. Например, если YA-сайт модифицированной направляющей области находится в пределах 10 нуклеотидов от 3'-концевого нуклеотида направляющей области, а длина направляющей области составляет 20 нуклеотидов, то модифицированный нуклеотид YA-сайта модифицированной направляющей области расположен в любом из положений 11-20. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения YA-сайт модифицированной направляющей области находится на нуклеотиде 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или 11 от 5'-конца 5'-конца или после него.

[00292] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения YA-сайт модифицированной направляющей области отличается от модификации 5'-конца. Например, онРНК может содержать модификацию 5'-конца, как описано в настоящем документе, и дополнительно содержать YA-сайт модифицированной направляющей области. Альтернативно, онРНК может содержать немодифицированный 5'-конец и YA-сайт модифицированной направляющей области. Альтернативно, короткая онРНК может содержать модифицированный 5'-конец и немодифицированный YA-сайт модифицированной направляющей области.

[00293] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения YA-сайт модифицированной направляющей области содержит модификацию, которую не содержит по меньшей мере один нуклеотид, расположенный на 5'-конце YA-сайта направляющей области. Например, если нуклеотиды 1-3 содержат фосфоротиоаты, нуклеотид 4 содержит только модификацию 2'-OMe, а нуклеотид 5 представляет собой пиримидин YA-сайта и содержит фосфоротиоат, то YA-сайт модифицированной направляющей области содержит модификацию (фосфотиоат) что по меньшей мере один нуклеотид, расположенный на 5'-конце YA-сайта направляющей области (нуклеотид 4), не содержит. В другом примере, если нуклеотиды 1-3 содержат фосфоротиоаты, а нуклеотид 4 представляет собой пиримидин YA-сайта и содержит 2'-OMe, то YA-сайт модифицированной направляющей области содержит модификацию (2'-OMe), в которой по меньшей мере один нуклеотид, расположенный 5' от YA-сайта направляющей области (любой из нуклеотидов 1-3), не содержит. Это условие также всегда выполняется, если немодифицированный нуклеотид расположен на 5'-конце YA-сайта модифицированной направляющей области.

[00294] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения YA-сайт

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

[00295] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения модифицированы 5’- и/или 3’-концевые области нРНК.

[00296] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения модифицированы концевые (т.е. последние) 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7 нуклеотидов в 3'-концевой области. В дальнейшем эта модификация может называться «модификацией 3’-конца». В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения модифицированы концевые (т.е. последние) 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7 нуклеотидов в 3'-концевой области содержат более одной модификации. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения модификация 3'-конца содержит или дополнительно содержит любое одно или большее количество следующего: модифицированный нуклеотид, выбранный из 2'-O-метил (2'-O-Me) модифицированного нуклеотида, 2'-O-(2 -метоксиэтил) (2'-O-moe) модифицированный нуклеотид, 2'-фтор (2'-F) модифицированный нуклеотид, фосфоротиоатная (PS) связь между нуклеотидами, инвертированный базовый модифицированный нуклеотид или их комбинации. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения модификация 3’-конца включает или дополнительно включает модификации 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7 нуклеотидов на 3’-конце нРНК. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения модификация 3’-конца содержит или дополнительно содержит одну связь PS, при этом связь находится между последним и предпоследним нуклеотидом. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения модификация 3’-конца содержит или дополнительно содержит две связи PS между последними тремя нуклеотидами. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения модификация 3’-конца содержит или дополнительно содержит четыре связи PS между последними четырьмя нуклеотидами. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения модификация 3’-конца содержит или дополнительно содержит связи PS между любым одним или большим количеством из последних 2, 3, 4, 5, 6 или 7 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения нРНК, содержащая модификацию 3'-конца, содержит или дополнительно содержит 3'-хвост, при этом 3'-хвост содержит модификацию любого одного или большего количества нуклеотидов, присутствующих в 3'-хвосте. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения 3’-хвост полностью модифицирован. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения 3'-хвост содержит 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 1-2, 1-3, 1-4, 1-5, 1-6, 1 -7, 1-8, 1-9 или 1-10 нуклеотидов, необязательно, где любой один или большее количество из этих

нуклеотидов модифицированы. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предлагается нРНК, содержащая модификацию 3’-защитного конца. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения 3'-хвост содержит от 1 до около 20 нуклеотидов, от 1 до около 15 нуклеотидов, от 1 до около 10 нуклеотидов, от 1 до около 5 нуклеотидов, от 1 до около 4 нуклеотидов, от 1 до около 3 нуклеотидов и от 1 до около 2 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления нРНК не содержит 3’-хвост.

[00297] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения модифицирована 5'-концевая область, например, модифицированы первые 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7 нуклеотидов нРНК. В дальнейшем эта модификация может называться «модификацией 5’-конца». В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения первые 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7 нуклеотидов 5'-концевой области содержат более одной модификации. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения модифицирован по меньшей мере один из концевых (т. е. первых) 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7 нуклеотидов на 5’-конце. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения модифицированы как 5’-, так и 3’-концевые области (например, концы) нРНК. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения модифицирована только 5'-концевая область нРНК. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения модифицирована только 3'-концевая область (плюс или минус 3'-хвост) консервативной части нРНК. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения нРНК содержит модификации в 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7 из первых 7 нуклеотидов в 5'-концевой области нРНК. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения нРНК содержит модификации 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7 из 7 концевых нуклеотидов в 3'-концевой области. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения модифицированы 2, 3 или 4 из первых 4 нуклеотидов в 5'-концевой области и/или 2, 3 или 4 из 4 концевых нуклеотидов в 3'-концевой области. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения 2, 3 или 4 из первых 4 нуклеотидов в 5'-концевой области связаны фосфоротиоатными (PS) связями. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения модификация 5'-конца и/или 3'-конца включает 2'-O-метил (2'-O-Me) или 2'-O-(2-метоксиэтил) (2'-O-Moe) модификация. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения модификация включает 2’-фтор (2’-F) модификацию нуклеотида. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения модификация включает фосфоротиоатную (PS) связь между нуклеотидами. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения модификация включает инвертированный нуклеотид нуклеотида. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения модификация включает модификацию защитного конца. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения модификация включает более одной модификации, выбранной из модификации защитного конца, 2'-O-Me, 2'-O-moe, 2'-фтор (2'-F), тиофосфатной (PS) связи между нуклеотидов и инвертированный нуклеотид. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения охватывается

эквивалентная модификация.

[00298] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предлагается нРНК, содержащая модификацию 5’-конца и модификацию 3’-конца. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения нРНК содержит модифицированные нуклеотиды, которые не находятся на 5’- или 3’-концах.

[00299] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предлагается онРНК, содержащая модификацию верхнего стержня, где модификация верхнего стержня включает модификацию любого одного или большего количества из US1-US12 в области верхнего стержня. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предлагается онРНК, содержащая модификацию верхнего стержня, где модификация верхнего стержня включает модификацию по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или всех 12 нуклеотидов в верхней части стебля. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предлагается онРНК, содержащая модификацию верхнего стержня, где модификация верхнего стержня включает 1, 2, 3, 4 или 5 YA-модификаций в YA-сайте. В некоторых вариантах осуществления модификация верхнего стержня содержит модифицированный нуклеотид 2’-OMe, модифицированный нуклеотид 2’-O-moe, модифицированный нуклеотид 2’-F и/или их комбинации. Другие модификации, описанные в настоящем документе, такие как модификация 5’-конца и/или модификация 3’-конца, могут быть объединены с модификацией верхнего стержня.

[00300] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения онРНК содержит модификацию в области шпильки. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения модификация шпилечного участка включает по меньшей мере один модифицированный нуклеотид, выбранный из 2'-О-метил (2'-OMe) модифицированного нуклеотида, 2'-фтор (2'-F) модифицированного нуклеотида и/или их комбинаций. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения модификация области шпильки находится в области шпильки 1. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения модификация области шпильки находится в области шпильки 2. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения модификация шпильки содержит 1, 2 или 3 YA-модификации в YA-сайте. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения модификация шпильки включает по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5 или 6 YA-модификаций. Другие модификации, описанные в настоящем документе, такие как модификация верхней части стержня, модификация 5'-конца и/или модификация 3'-конца, могут быть объединены с модификацией в области шпильки.

[00301] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения нРНК содержит замещенную и необязательно укороченную область шпильки 1, где по меньшей мере одна из следующих пар нуклеотидов заменена в замещенной и необязательно укороченной шпильке 1 нуклеотидами спаривания Уотсона-Крика: H1-1 и H1-12, H1-2 и H1-11, H1-3 и H1-10 и/или H1-4 и H1-9. «Парные нуклеотиды Уотсона-Крика» включают любую пару, способную образовывать пару оснований Уотсона-Крика, включая пары A-T,

A-U, T-A, U-A, C-G и G-C, а также пары, включающие модифицированные версии любого из вышеуказанных нуклеотидов, которые имеют одинаковые предпочтения в паре оснований. В некоторых вариантах осуществления в области шпильки 1 отсутствуют какие-либо один или два из H1-5-H1-8. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения в области шпильки 1 отсутствуют одна, две или три из следующих пар нуклеотидов: H1-1 и H1-12, H1-2 и H1-11, H1-3 и H1-10 и/или H1-4 и H1-9. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения в области шпильки 1 отсутствуют 1-8 нуклеотидов области шпильки 1. В любом из приведенных выше вариантов осуществления настоящего изобретения отсутствующие нуклеотиды могут быть такими, что одна или большее количество пар нуклеотидов заменены парами нуклеотидов Уотсона-Крика (H1-1 и H1-12, H1-2 и H1-11, H1-3 и H1- 10, и/или H1-4 и H1-9) образуют пару оснований в нРНК.

[00302] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения нРНК дополнительно содержит участок верхнего стержня, в котором отсутствует по меньшей мере 1 нуклеотид, например, любой из укороченных участков верхнего стержня, указанных в Таблице 7 заявки США № 62/946905, содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки целиком или описанные в другом месте в данном документе, которые могут быть объединены с любой из укороченных или замещенных областей шпильки 1, описанных в данном документе.

[00303] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения онРНК, предложенная в настоящем документе, представляет собой короткую одиночную РНК-направляемую (короткие онРНК), например, содержащую консервативную часть онРНК, содержащую область шпильки, при этом в области шпильки отсутствует по меньшей мере 5-10 нуклеотидов или 6-10 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения 5-10 нуклеотидов или 6-10 нуклеотидов являются смежными.

[00304] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения в короткой онРНК отсутствуют по меньшей мере нуклеотиды 54-58 (AAAAA) консервативной части онРНК spyCas9. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения короткая онРНК представляет собой онРНК, не относящуюся к spyCas9, в которой отсутствуют нуклеотиды, соответствующие нуклеотидам 54-58 (AAAAA) консервативной части spyCas9, как определено, например, путем парного или структурного выравнивания.

[00305] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения короткая онРНК, описанная в настоящем документе, содержит консервативную часть, содержащую область шпильки, где в области шпильки отсутствуют 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения недостающие нуклеотиды составляют 5-10 недостающих нуклеотидов или 6-10 недостающих нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения недостающие нуклеотиды расположены последовательно. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения недостающие нуклеотиды охватывают по меньшей мере часть шпильки 1 и часть шпильки 2. В некоторых вариантах

осуществления настоящего изобретения недостающие 5-10 нуклеотидов включают или состоят из нуклеотидов 54-58, 54-61 или 53-60 SEQ ID NO: 172.

[00306] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения короткая онРНК, описанная в настоящем документе, дополнительно содержит нексусную область, при этом в нексусной области отсутствует по меньшей мере один нуклеотид (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 нуклеотидов в нексусная область). В некоторых вариантах осуществления у короткой онРНК отсутствует каждый нуклеотид в нексусной области.

[00307] В некоторых вариантах осуществления описанная в настоящем документе короткая онРНК SpyCas9 содержит последовательность NNNNNNNNNNNNNNNNNNNGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCACGAAAGGGCACCGAGUCGGUGCU (SEQ ID NO: 1005).

[0001] В некоторых вариантах осуществления короткая онРНК, описанная в настоящем документе, содержит паттерн модификации, как показано в mN*mN*mN*NNNNNNNNNNNNNNNNNGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCACGAAAGGGCACCGAGUCGGmUmGmC*mU (SEQ ID NO: 1006), где A, C, G, U и N представляют собой аденин, цитозин, гуанин, урацил и любой рибонуклеотид соответственно, если не указано иное. Символ m указывает на модификацию 2'O-метила, а * указывает на фосфоротиоатную связь между нуклеотидами.

[0002] В некоторых вариантах осуществления с использованием SEQ ID NO: 172 («иллюстративная онРНК-1 SpyCas9») например, иллюстративная онРНК-1 SpyCas9 дополнительно содержит одно или более из:

A. укороченная область шпильки 1 или замещенная и необязательно укороченная область шпильки 1, при этом

1. по меньшей мере одна из следующих пар нуклеотидов заменена в шпильке 1 нуклеотидами пары Уотсона-Крика: H1-1 и H1-12, H1-2 и H1-11, H1-3 и H1-10 или H1-4 и H1-9, а область шпильки 1 необязательно отсутствует

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

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

c. 1-8 нуклеотидов шпильки области 1; или

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

a. одно или более положений H1-1, H1-2 или H1-3 удалены или заменены по сравнению с иллюстративной онРНК-1 SpyCas9 (SEQ ID NO: 172) или

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

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

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

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

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

1. модифицированный нуклеотид необязательно выбирают из 2'-O-метил (2'-OMe) модифицированного нуклеотида, 2'-O-(2-метоксиэтил) (2'-O-moe) модифицированного нуклеотида, 2'-фтор (2'-F) модифицированного нуклеотида, фосфоротиоатной (PS) связи между нуклеотидами, инвертированного безосновного модифицированного нуклеотида или их комбинации; или

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

[0003] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения репрезентативная онРНК-1 SpyCas9 или онРНК, такая как онРНК, содержащая репрезентативную онРНК-1 SpyCas9, дополнительно включает 3'-хвост, например, 3'-хвост из 1, 2, 3, 4 или большего количества нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения хвост включает один или большее количество модифицированных нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения модифицированный нуклеотид выбирают из 2'-O-метил (2'-OMe) модифицированного нуклеотида, 2'-O-(2-метоксиэтил) (2'-O-moe) модифицированного нуклеотида, 2'-фтор-(2'-F) модифицированный нуклеотид, фосфоротиоатная (PS) связь между нуклеотидами, инвертированный базовый модифицированный нуклеотид или их комбинация. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения модифицированный нуклеотид включает модифицированный нуклеотид 2'-OMe. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения модифицированный нуклеотид включает PS связь между нуклеотидами. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения модифицированный нуклеотид включает модифицированный нуклеотид 2'-OMe и PS связь между нуклеотидами.

[00308]

[00309] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения нРНК, описанная в настоящем документе, дополнительно содержит нексусную область, при этом в нексусной области отсутствует по меньшей мере один нуклеотид.

[00310] В некоторых вариантах осуществления нРНК является химически модифицированной. нРНК, содержащая один или большее количество

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

[00311] Химические модификации, такие как перечисленные выше, могут быть объединены для получения модифицированных нРНК, содержащих нуклеозиды и нуклеотиды (все вместе именуемые «остатки»), которые могут иметь две, три, четыре или более модификаций. Например, модифицированный остаток может иметь модифицированный сахар и модифицированное азотистое основание. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения каждое основание нРНК модифицировано, *например*, все основания имеют модифицированную фосфатную группу, такую как фосфоротиоатная группа. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения все или по существу все фосфатные группы молекулы нРНК заменены фосфоротиоатными группами. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения модифицированные нРНК содержат по меньшей мере один модифицированный остаток на 5'-конце РНК или вблизи него. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения модифицированные нРНК содержат по меньшей мере один модифицированный остаток на 3'-конце РНК или вблизи него.

[00312] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения нРНК содержит один, два, три или большее количество модифицированных остатков. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 5% (например, по меньшей мере 5%, по меньшей мере 10%, по меньшей мере 15%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 25%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 35%, по меньшей мере 40% , по меньшей мере 45%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере

80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или 100%) положений в модифицированной нРНК представляют собой модифицированные нуклеозиды или нуклеотиды.

[00313] В некоторых вариантах осуществления каркасной модификации, фосфатная группа модифицированного остатка может быть модифицирована путем замены одного или большего количества атомов кислорода другим заместителем. Кроме того, модифицированный остаток, *например*, модифицированный остаток, присутствующий в модифицированной нуклеиновой кислоте, может включать полную замену немодифицированной фосфатной группы модифицированной фосфатной группой, как описано в данном документе. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения модификация основной фосфатной цепи может включать изменения, которые приводят или к незаряженному линкеру, или к заряженному линкеру с несимметричным распределением заряда.

[00314] Примеры модифицированных фосфатных групп включают фосфоротиоат, фосфороселенаты, боранофосфаты, сложные фосфатные эфиры борана, гидрофосфонаты, фосфороамидаты, алкильные или арильные фосфонаты и сложные фосфотриэфиры.

[00315] Также могут быть сконструированы каркасы, которые могут имитировать нуклеиновые кислоты, в которых фосфатный линкер и рибозный сахар заменены устойчивыми к нуклеазе нуклеозидами или заменителями нуклеотидов. Такие модификации могут включать модификации остова и сахара. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения азотистые основания могут быть связаны суррогатным остовом. Примеры могут включать, без ограничения, заменители нуклеозидов морфолино, циклобутил, пирролидин и пептидную нуклеиновую кислоту (PNA).

[00316] Модифицированные нуклеозиды и модифицированные нуклеотиды могут включать одну или большее количества модификаций сахарной группы, *т.е.* модификацию сахаров. Например, 2'-гидроксильная группа (OH) может быть модифицирована, *т.е.* заменены рядом различных «окси» или «дезокси» заместителей. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения модификации 2'-гидроксильной группы могут повышать стабильность нуклеиновой кислоты, поскольку гидроксил больше не может депротонироваться с образованием 2'-алкоксид-иона. Примеры модификаций 2'-гидроксильной группы могут включать алкокси или арилокси (OR, при этом «R» может быть, *например*, алкилом, циклоалкилом, арилом, аралкилом, гетероарилом или сахаром); полиэтиленгликоли (PEG), $O(CH_2CH_2O)_nCH_2CH_2OR$, при этом R может быть, *например*, H или необязательно замещенным алкилом, а n может быть целым числом от 0 до 20. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения модификация 2'-гидроксильной группы может представлять собой 2'-O-Me. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения модификация 2'-гидроксильной группы может представлять собой модификацию 2'-фтора, которая заменяет 2'-гидроксильную группу фторидом. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения

модификация 2'-гидроксильной группы может включать «закрытые» нуклеиновые кислоты (LNA), в которых 2'-гидроксил может быть соединен, *например*, с помощью C_{1-6} алкиленового или C_{1-6} гетероалкиленового мостика с 4'-углеродным мостиком того же рибозного сахара, при этом типичные мостики могут включать метиленовые, пропиленовые, эфирные или аминные мостики. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения модификация 2'-гидроксильной группы может включать «незаблокированные» нуклеиновые кислоты (UNA), в которых в кольце рибозы отсутствует связь C2'-C3'. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения модификация 2'-гидроксильной группы может включать метоксиэтильную группу (MOE), ($OCH_2CH_2OCH_3$, *например*, производное PEG).

[00317] Модификации «дезокси» 2' могут включать водород (*т.е.* дезоксирибозные сахара, *например*, в выступающих частях частично дсРНК); галоген (*например*, бром, хлор, фтор или йод); амино (при этом амино может представлять собой, *например*, NH_2; алкиламино, диалкиламино, гетероциклил, ариламино, диариламино, гетероариламино, дигетероариламино или аминокислоту); $NH(CH_2CH_2NH)_nCH2CH_2$-амино (при этом амино может быть, *например*, таким, как описано в настоящем документе), -NHC(O)R (при этом R может быть, *например*, алкилом, циклоалкилом, арилом, аралкилом, гетероарилом или сахаром), циано; меркапто; алкилтиоалкил; тиоалкокси; и алкил, циклоалкил, арил, алкенил и алкинил, которые могут быть необязательно замещены, *например*, амино, как описано в настоящем документе.

[00318] Модификация сахара может включать сахарную группу, которая также может содержать один или большего количества атомов углерода, обладающих стереохимической конфигурацией, противоположной конфигурации соответствующего углерода в рибозе. Таким образом, модифицированная нуклеиновая кислота может включать нуклеотиды, содержащие, *например*, арабинозу в качестве сахара. Модифицированные нуклеиновые кислоты могут также включать низкоосновные сахара. Эти низкоосновные сахара также могут быть дополнительно модифицированы по одному или большим количеством составляющим атомам сахара. Модифицированные нуклеиновые кислоты могут также включать один или большее количество сахаров в L форме, *например L нуклеозиды.*

[00319] Описанные в настоящем документе модифицированные нуклеозиды и модифицированные нуклеотиды, которые могут быть включены в модифицированную нуклеиновую кислоту, могут включать модифицированное основание, также называемое нуклеооснованием. Примеры азотистых оснований включают, но не ограничиваются ими, аденин (A), гуанин (G), цитозин (C) и урацил (U). Эти азотистые основания могут быть модифицированы или полностью заменены для получения модифицированных остатков, которые могут быть включены в модифицированные нуклеиновые кислоты. Нуклеотидное основание нуклеотида может быть независимо выбрано из пурина, пиримидина, аналога пурина или аналога пиримидина. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения азотистое основание может включать, например,

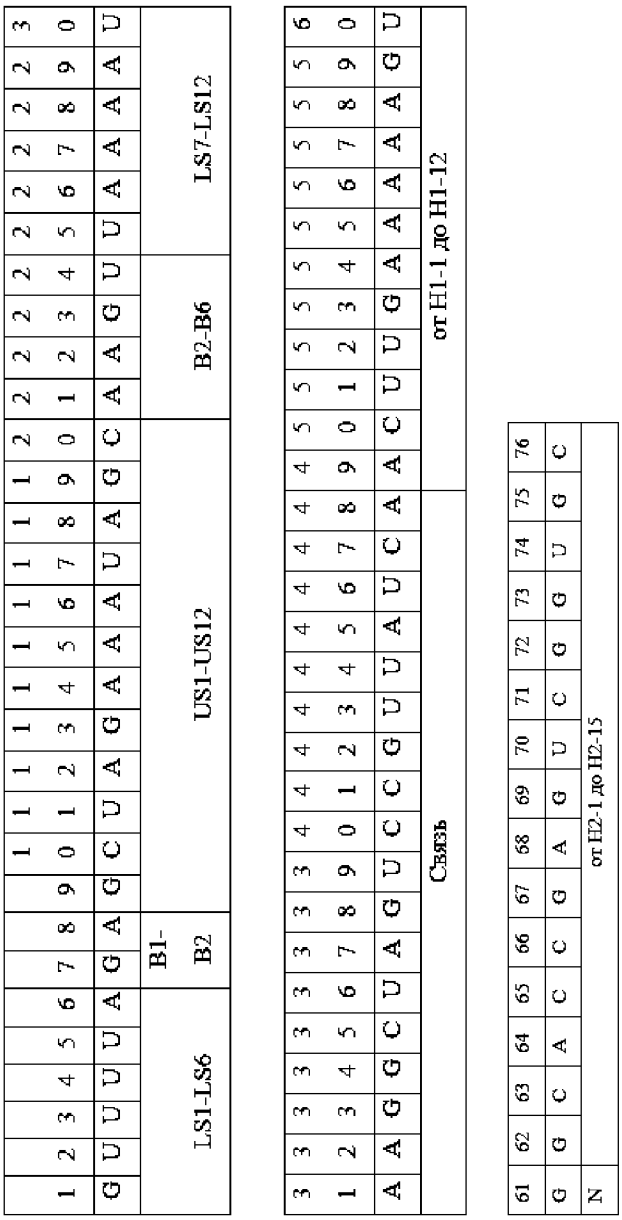
встречающиеся в природе и синтетические производные основания.

[00320] В вариантах осуществления настоящего изобретения, применяющих двойную РНК-направляемую, каждая из crРНК и tracr РНК может содержать модификации. Такие модификации могут быть на одном или обоих концах crРНК и/или tracr РНК. В вариантах осуществления настоящего изобретения, содержащих онРНК, один или большее количество остатков на одном или обоих концах онРНК могут быть химически модифицированы, или вся онРНК может быть химически модифицирована. Некоторые варианты осуществления настоящего изобретения включают модификацию 5'-конца. Некоторые варианты осуществления настоящего изобретения включают модификацию 3'-конца. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения один или большее количество или все нуклеотиды в выступающем одноцепочечном выступе молекулы нРНК представляют собой дезоксинуклеотиды.

[00321] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения нРНК, описанные в настоящем документе, содержат один из паттернов модификации, описанных в WO2018/107028 A1, опубликованной 14 июня 2018 г., содержание которой полностью включено в настоящий документ посредством ссылки.

[00322] Термины «mA», «mC», «mU» или «mG» могут применятся для обозначения нуклеотида, модифицированного 2’-O-Me. Термины «fA», «fC», «fU» или «fG» могут применятся для обозначения нуклеотида, который был заменен на 2’-F. Знак «*» может применятся для обозначения PS модификации. Термины A*, C*, U* или G* могут применятся для обозначения нуклеотида, который связан со следующим (например, 3’) нуклеотидом PS связью. Термины «mA*», «mC*», «mU*» или «mG*» могут применятся для обозначения нуклеотида, который был заменен на 2'-O-Me и который связан со следующим (например, 3') нуклеотид со PS связью.

Иллюстративная онРНК-1 spyCas9 (SEQ ID NO: 172)



Рибонуклеопротеиновый комплекс

[00323] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предлагаются композиции, содержащие одну или большее количество нРНК, содержащих одну или большее количество направляющих последовательностей из **Таблицы 2**, и РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, *например*, нуклеазу, такую как Cas нуклеаза, такая как Cas9. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения РНК-направляемый ДНК-связывающий агент обладает клевазной активностью, которая также может упоминаться как двухцепочечная эндонуклеазная активность. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения РНК-направляемый ДНК-связывающий агент содержит нуклеазу Cas. Примеры нуклеаз Cas9 включают в себя системы CRISPR типа II S. pyogenes, S. Aureus и других прокариот (см., например, перечень в следующем параграфе) и их модифицированные (например, сконструированные или мутантные) варианты. *См., например*, US 2016/0312198 A1; US 2016/0312199 A1. Другие примеры Cas-нуклеаз включают комплекс Csm или Cmr системы

CRISPR типа III или ее субъединицу Cas10, Csm1 или Cmr2; и комплекс Cascade системы CRISPR типа I или ее субъединицу Cas3. В некоторых вариантах осуществления Cas-нуклеаза может происходить из системы типа IIA, типа IIB или типа IIC. Для обсуждения различных систем CRISPR и нуклеаз Cas, см., например, Makarova et al., NAT. REV. MICROBIOL. 9:467-477 (2011); Makarova et al., NAT. REV. MICROBIOL, 13: 722-36 (2015); Shmakov et al., MOLECULAR CELL, 60:385-397 (2015). В некоторых вариантах осуществления РНК-направляемый ДНК-связывающий агент содержит никазу Cas. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения РНК-направляемая никаза модифицирована или получена из белка Cas, такого как нуклеаза Cas класса 2 (которая может представлять собой, например, нуклеазу Cas типа II, V или VI). Нуклеаза Cas класса 2 включает, например, белки Cas9, Cpf1, C2c1, C2c2 и C2c3, и их модификации.

[00324] Неограничивающие иллюстративные виды, из которых может быть получена Cas-нуклеаза или Cas никаза, включают Streptococcus pyogenes, Streptococcus thermophilus, Streptococcus sp., Staphylococcus aureus, Listeria innocua, Lactobacillus gasseri, Francisella novicida, Wolinella succinogenes, Sutterella wadsworthensis, Gammaproteobacterium, Neisseria meningitidis, Campylobacter jejuni, Pasteurella multocida, Fibrobacter succinogene, Rhodospirillum rubrum, Nocardiopsis dassonvillei, Streptomyces pristinaespiralis, Streptomyces viridochromogenes, Streptomyces viridochromogenes, Streptosporangium roseum, Streptosporangium roseum, Alicyclobacillus acidocaldarius, Bacillus pseudomycoides, Bacillus selenitireducens, Exiguobacterium sibiricum, Lactobacillus delbrueckii, Lactobacillus salivarius, Lactobacillus buchneri, Treponema denticola, Microscilla marina, Burkholderiales bacterium, Polaromonas naphthalenivorans, Polaromonas sp., Crocosphaera watsonii, Cyanothece sp., Microcystis aeruginosa, Synechococcus sp., Acetohalobium arabaticum, Ammonifex degensii, Caldicelulosiruptor becscii, Candidatus Desulforudis, Clostridium botulinum, Clostridium difficile, Finegoldia magna, Natranaerobius thermophilus, Pelotomaculum thermopropionicum, Acidithiobacillus caldus, Acidithiobacillus ferrooxidans, Allochromatium vinosum, Marinobacter sp., Nitrosococcus halophilus, Nitrosococcus watsoni, Pseudoalteromonas haloplanktis, Ktedonobacter racemifer, Methanohalobium evestigatum, Anabaena variabilis, Nodularia spumigena, Nostoc sp., Arthrospira maxima, Arthrospira platensis, Arthrospira sp., Lyngbya sp., Microcoleus chthonoplastes, Oscillatoria sp., Petrotoga mobilis, Thermosipho africanus, Streptococcus pasteurianus, Neisseria cinerea, Campylobacter lari, Parvibaculum lavamentivorans, Corynebacterium diphtheria, Acidaminococcus sp., Lachnospiraceae sp. ND2006, и Acaryochloris marina.

[00325] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения Cas нуклеаза представляет собой Cas9 нуклеазу из Streptococcus pyogenes. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения Cas нуклеаза представляет собой Cas9 нуклеазу из Streptococcus thermophilus. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения Cas нуклеаза представляет собой Cas9 нуклеазу из Neisseria meningitidis. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения Cas нуклеаза представляет

собой Cas9 нуклеазу из Staphylococcus aureus. В некоторых вариантах осуществления Cas-нуклеаза представляет собой нуклеазу Cpf1 из Francisella novicida. В некоторых вариантах осуществления Cas-нуклеаза представляет собой нуклеазу Cpf1 из Acidaminococcus sp. В некоторых вариантах осуществления Cas-нуклеаза представляет собой нуклеазу Cpf1 из Lachnospiraceae sp ND2006. В других вариантах осуществления Cas-нуклеаза представляет собой нуклеазу Cpf1 из Francisella tularensis, Lachnospiraceae sp., Butyrivibrio proteoclasticus, Peregrinibacteria bacterium, Parcubacteria bacterium, Smithella, Acidaminococcus, Candidatus Methanoplasma termitum, Eubacterium eligens, Moraxella bovoculi, Leptospira inadai, Porphyromonas crevioricanis, Prevotella disiens или Porphyromonas macacae. В определенных вариантах осуществления Cas-нуклеаза представляет собой нуклеазу Cpf1 из Acidaminococcus или Lachnospiraceae.

[00326] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения Cas никаза получена из Cas9 нуклеазы из Streptococcus pyogenes. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения Cas никаза получена из Cas9 нуклеазы из Streptococcus thermophilus. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения Cas никаза представляет собой никазную форму Cas9 нуклеазы из Neisseria meningitidis. См., например, WO/2020081568, описывающий слитый белок никазы Nme2Cas9 D16A. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения Cas никаза получена из Cas9 нуклеазы из Staphylococcus aureus. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения Cas никаза получена из Cpf1 нуклеазы из Francisella novicida. В некоторых вариантах осуществления Cas никаза получена из нуклеазы Cpf1 из Acidaminococcus sp. В некоторых вариантах осуществления Cas никаза получена из нуклеазы Cpf1 из Lachnospiraceae bacterium ND2006. В дополнительных вариантах осуществления настоящего изобретения Cas никаза получена из Cpf1 нуклеазы из Francisella tularensis, Lachnospiraceae bacterium, Butyrivibrio proteoclasticus, Peregrinibacteria bacterium, Parcubacteria bacterium, Smithella, Acidaminococcus, Candidatus Methanoplasma termitum, Eubacterium eligens, Moraxella bovoculi, Leptospira *inadai, Porphyromonas crevioricanis, Prevotella disiens, или Porphyromonas macacae*. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения Cas никаза происходит от Cpf1 нуклеазы из Acidaminococcus или Lachnospiraceae. Как обсуждалось в другом месте, никаза может быть получена из нуклеазы путем инактивации одного из двух каталитических доменов, например, путем мутации остатка активного сайта, необходимого для нуклеолиза, такого как D10, H840, N863 в Spy Cas9. Специалист в данной области техники должен быть знаком с методами простой идентификации соответствующих остатков в других Cas белках, такими как выравнивание последовательностей и структурное выравнивание, которые подробно обсуждаются ниже.

[00327] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения нРНК вместе с РНК-направляемым ДНК-связывающим агентом, называется рибонуклеопротеиновым комплексом (RNP). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения РНК-направляемый ДНК-связывающий агент представляет собой

Cas нуклеазу. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения нРНК вместе с Cas нуклеазой называется Cas RNP. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения RNP содержит компоненты типа I, типа II или типа III. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения Cas нуклеаза представляет собой Cas9 белок из системы CRISPR/Cas типа II. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения нРНК вместе с Cas9 называется Cas9 RNP.

[00328] Cas9 дикого типа имеет два нуклеазных домена RuvC и HNH. Домен RuvC расщепляет нецелевую цепь ДНК, а домен HNH расщепляет целевую цепь ДНК. В некоторых вариантах осуществления белок Cas9 содержит более одного домена RuvC и/или более одного домена HNH. В некоторых вариантах осуществления белок Cas9 представляет собой белок Cas9 дикого типа. В каждом из вариантов композиции, применения и способа Cas индуцирует двухцепочечный разрыв направляющей ДНК.

[00329] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения применяются химерные нуклеазы Cas, при этом один домен или область белка заменены частью другого белка. В некоторых вариантах осуществления домен нуклеазы Cas может быть заменен доменом другой нуклеазы, такой как Fok1. В некоторых вариантах осуществления нуклеаза Cas может представлять собой модифицированную нуклеазу.

[00330] В других вариантах осуществления настоящего изобретения нуклеаза Cas может происходить из системы CRISPR/Cas типа I. В некоторых вариантах осуществления нуклеаза Cas может представлять собой компонент комплекса Cascade системы CRISPR/Cas типа I. В некоторых вариантах осуществления нуклеаза Cas может представлять собой белок Cas3. В некоторых вариантах осуществления нуклеаза Cas может происходить из системы CRISPR/Cas типа III. В некоторых вариантах осуществления нуклеаза Cas может иметь активность расщепления РНК.

[00331] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения РНК-направляемый ДНК-связывающий агент обладает одноцепочечной никазной активностью, то есть может разрезать одну цепь ДНК с образованием разрыва одной цепи, также известного как «разрез». В некоторых вариантах осуществления РНК-направляемый ДНК-связывающий агент содержит никазу Cas. Никаза представляет собой фермент, который создает разрыв в двухцепочечной ДНК, то есть разрезает одну цепь двойной спирали ДНК, но не другую. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения никаза Cas представляет собой вариант нуклеазы Cas (например, нуклеазы Cas, описанной выше), в котором эндонуклеолитический активный центр инактивирован, например, одним или большим количеством изменений (*например*, точечными мутациями) в каталитическом домене. См., например, патент США № 8889356 в отношении обсуждения Cas-никаз и иллюстративных изменений каталитического домена. В некоторых вариантах осуществления Cas-никаза, такая как никаза Cas9, имеет инактивированный домен RuvC или HNH.

[00332] В некоторых вариантах осуществления РНК-направляемый ДНК-связывающий агент модифицируют так, что он содержит только один функциональный

домен нуклеазы. Например, белок-агент может быть модифицирован таким образом, что один из доменов нуклеазы мутирует, или полностью, или частично удаляется, чтобы снизить его активность по расщеплению нуклеиновых кислот. В некоторых вариантах осуществления используют никазу, имеющую домен RuvC с пониженной активностью. В некоторых вариантах осуществления используют никазу, имеющую неактивный домен RuvC. В некоторых вариантах осуществления используют никазу, имеющую домен HNH с пониженной активностью. В некоторых вариантах осуществления используют никазу, имеющую неактивный домен HNH.

[00333] В некоторых вариантах осуществления консервативную аминокислоту в домене белка-нуклеазы Cas замещают для снижения или изменения нуклеазной активности. В некоторых вариантах осуществления Cas-нуклеаза может содержать аминокислотную замену в RuvC или RuvC-подобном нуклеазном домене. Типовые аминокислотные замены в RuvC или RuvC-подобном нуклеазном домене включают D10A (на основе белка Cas9 S. pyogenes). См., например, Zetsche et al. (2015) Cell Oct 22:163(3): 759-771. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения нуклеаза Cas может содержать аминокислотную замену в HNH или HNH-подобном нуклеазном домене. Иллюстративные аминокислотные замены в HNH или HNH-подобном нуклеазном домене включают E762A, H840A, N863A, H983A и D986A (на основе белка Cas9 S. pyogenes). См., например, Zetsche et al. (2015). Другие иллюстративные аминокислотные замены включают D917A, E1006A и D1255A (на основе последовательности Francisella novicida U112 Cpf1 (FnCpf1) (UniProtKB - A0Q7Q2 (CPF1_FRATN)).

[00334] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения мРНК, кодирующая никазу, предложена в комбинации с парой РНК-направляемых, которые комплементарны смысловой и антисмысловой цепям целевой последовательности, соответственно. В данном варианте осуществления направляющие РНК направляют никазу на целевую последовательность и вводят DSB путем образования одноцепочечных разрывов на противоположных цепях целевой последовательности (то есть, двойной одноцепочечный разрыв). В некоторых вариантах осуществления использование двойного одноцепочечного разрыва может улучшать специфичность и уменьшать побочные эффекты. В некоторых вариантах осуществления никаза используется вместе с двумя отдельными направляющими РНК, нацеленными на противоположные цепи ДНК, для создания двойного одноцепочечного разрыва в целевой ДНК. В некоторых вариантах осуществления никаза используется вместе с двумя отдельными направляющими РНК, которые выбраны так, чтобы они находились в непосредственной близости, для создания двойного одноцепочечного разрыва в целевой ДНК.

[00335] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения РНК-направляемый ДНК-связывающий агент не обладает клевазной и никазной активностью. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения РНК-направляемый ДНК-связывающий агент содержит ДНК-связывающий полипептид dCas. Полипептид dCas обладает ДНК-связывающей активностью, при этом по существу не обладает

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

[00336] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения РНК-направляемый ДНК-связывающий агент содержит один или большее количество гетерологичных функциональных доменов (например, представляет собой или содержит слитый полипептид).

[00337] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения РНК-направляемый ДНК-связывающий агент содержит APOBEC3 дезаминазу. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения APOBEC3 дезаминаза представляет собой APOBEC3A (A3A). В некоторых вариантах осуществления A3A представляет собой A3A человека. В некоторых вариантах осуществления A3A представляет собой A3A дикого типа.

[00338] В некоторых вариантах осуществления РНК-направляемый ДНК-связывающий агент содержит дезаминазу и РНК-направляемую никазу. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения мРНК дополнительно содержит линкер для связывания последовательности, кодирующей A3A, с последовательностью, кодирующей РНК-направляемую никазу. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения линкер представляет собой органическую молекулу, группу, полимер или химический фрагмент. В некоторых вариантах реализации данного изобретения линкер представляет собой пептидный линкер. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения пептидный линкер представляет собой любой участок аминокислот, содержащий по меньшей мере 1, по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 6, по меньшей мере 7, по меньшей мере 8, по меньшей мере 9, по меньшей мере 10, по меньшей мере 15, по меньшей мере 20, по меньшей мере 25, по меньшей мере 30, по меньшей мере 40, по меньшей мере 50 или большее количество аминокислот. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения пептидный линкер представляет собой линкер «XTEN» из 16 остатков или его вариант (см., например, «Примеры» и Schellenberger et al. A recombinant polypeptide extends the in vivo half-life of peptides and proteins in a tunable manner. Nat. Biotechnol. 27, 1186-1190 (2009)). В некоторых вариантах осуществления линкер XTEN включает последовательность SGSETPGTSESATPES (SEQ ID NO: 900), SGSETPGTSESA (SEQ ID NO: 901) или SGSETPGTSESATPEGGSGGS (SEQ ID NO: 902). В некоторых вариантах осуществления пептидный линкер содержит одну или несколько

последовательностей, выбранных из SEQ ID NO: 903-913.

[00339] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения гетерологичный функциональный домен может облегчать транспорт РНК-направляемого ДНК-связывающего агента в ядро клетки. Например, гетерологичный функциональный домен может представлять собой сигнал ядерной локализации (NLS). В некоторых вариантах осуществления РНК-направляемый ДНК-связывающий агент может быть слит с 1-10 NLS. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения РНК-направляемый ДНК-связывающий агент может быть слит с 1-5 NLS. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения РНК-направляемый ДНК-связывающий агент может быть слит с одним NLS. Если применяется один NLS, то NLS может быть слит на N-конце или С-конце последовательности РНК-направляемого ДНК-связывающего агента. Он также может быть вставлен в последовательность РНК-направляемого ДНК-связывающего агента. В других вариантах осуществления настоящего изобретения РНК-направляемый ДНК-связывающий агент может быть слит с более чем одним NLS. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения РНК-направляемый ДНК-связывающий агент может быть слит с 2, 3, 4 или 5 NLS. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения РНК-направляемый ДНК-связывающий агент может быть слит с двумя NLS. В определенных обстоятельствах два NLS могут быть одинаковыми (*например*, два NLS SV40) или разными. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения РНК-направляемый ДНК-связывающий агент слит с двумя последовательностями NLS (например, SV40), слитыми на карбокси конце. В некоторых вариантах осуществления РНК-направляемый ДНК-связывающий агент может быть слит с двумя NLS, один из которых связан на N-конце, а другой - на С-конце. В некоторых вариантах осуществления РНК-направляемый ДНК-связывающий агент может быть слит с 3 NLS. В некоторых вариантах осуществления РНК-направляемый ДНК-связывающий агент может быть слит без NLS. В некоторых вариантах осуществления NLS может представлять собой одинарную последовательность, такую как, например, SV40 NLS, PKKKRKV(SEQ ID NO: 600) или PKKKRRV (SEQ ID NO: 601). В некоторых вариантах осуществления NLS может представлять собой двухчастичную последовательность, такую как NLS нуклеоплазмина, KRPAATKKAGQAKKKK (SEQ ID NO: 602). В конкретном варианте осуществления один PKKKRKV (SEQ ID NO: 600) NLS может быть конденсированный на С-конце РНК-направляемого ДНК-связывающего агента. В сайт слияния необязательно включены один или более линкеров.

[00340] В некоторых вариантах осуществления РНК-направляемый ДНК-связывающий агент содержит редактор. Примером редактора является BC22n, который включает APOBEC3A H. sapiens, слитую с никазой Cas9 S. pyogenes-D10A с помощью линкера XTEN, и мРНК, кодирующую BC22n. Предоставляется мРНК, кодирующая BC22n (SEQ ID NO:804).

[00341] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения

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

[00342] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения гетерологичный функциональный домен может представлять собой маркерный домен. Неограничивающие примеры маркерных доменов включают в себя флуоресцентные белки, метки очистки, метки эпитопа и последовательности репортерных генов. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения маркерный домен может представлять собой флуоресцентный белок. Неограничивающие примеры подходящих флуоресцентных белков включают зеленые флуоресцентные белки (например, GFP, GFP-2, tagGFP, turboGFP, sfGFP, EGFP, Emerald, Azami Green, мономерный Azami Green, CopGFP, AceGFP, ZsGreen1), желтые флуоресцентные белки (например, YFP, EYFP, Citrine, Venus, YPet, PhiYFP, ZsYellow1), синие флуоресцентные белки (например, EBFP, EBFP2, Azurite, mKalamal, GFPuv, Sapphire, T-sapphire), голубые флуоресцентные белки (например, ECFP, Cerulean, CyPet, AmCyan1, Midoriishi-Cyan), красные флуоресцентные

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

[00343] В дополнительных вариантах осуществления гетерологичный функциональный домен может нацеливать РНК-направляемый ДНК-связывающий агент на конкретную органеллу, тип клетки, ткань или орган. В некоторых вариантах осуществления гетерологичный функциональный домен может нацеливать РНК-направляемый ДНК-связывающий агент на митохондрии.

[00344] В дополнительных вариантах осуществления настоящего изобретения гетерологичный функциональный домен может представлять собой редакторный домен. Если РНК-направляемый ДНК-связывающий агент направляется на его последовательность, *например*, когда нуклеаза Cas направляется на целевую последовательность с помощью нРНК, эффектор, такой как редактор домена, может модифицировать целевую последовательность или воздействовать на нее. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения эффекторный домен, такой как редактор домена, может быть выбран из связывающего нуклеиновые кислоты домена, домена нуклеазы (например, домена отличной от нуклеазы Cas), домена эпигенетической модификации, активирующего транскрипцию домена или домена транскрипционного репрессора. В некоторых вариантах осуществления гетерологичный функциональный домен представляет собой нуклеазу, такую как нуклеаза FokI. См., например, патент US № 9023649. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения гетерологичный функциональный домен представляет собой транскрипционный активатор или репрессор. См., например, Qi et al., “Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression,” Cell 152:1173-83 (2013); Perez-Pinera et al., “RNA-guided gene activation by CRISPR-Cas9-based transcription factors,” Nat. Methods 10:973-6 (2013); Mali et al., “CAS9 transcriptional activators for target specificity screening and paired nickases for cooperative genome engineering,” Nat. Biotechnol. 31:833-8 (2013); Gilbert et al., “CRISPR-mediated modular RNA-guided regulation of transcription in eukaryotes,” Cell 154:442-51 (2013). Как таковой, РНК-направляемый ДНК-связывающий агент по существу

становится фактором транскрипции, который может быть направлен на связывание желаемой целевой последовательности с использованием гидовой РНК.

Определение эффективности направляющих РНК

[00345] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения эффективность направляющей РНК определяется при доставке или экспрессии вместе с другими компонентами (*например*, РНК-направляемым ДНК-связывающим агентом), образующими RNP. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения направляющая РНК экспрессируется вместе с РНК-направляемым ДНК-связывающим, таким как белок Cas, *например*, Cas9. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения направляющая РНК доставляется или экспрессируется в клеточной линии, которая уже стабильно экспрессирует РНК-направляемую ДНК-нуклеазу, такую как нуклеаза или никаза Cas, *например*, нуклеаза или никаза Cas9. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения направляющая РНК доставляется в клетку как часть RNP. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения направляющая РНК доставляется в клетку вместе с мРНК, кодирующей РНК-направляемую ДНК-нуклеазу, такую как нуклеаза или никаза Cas, *например*, нуклеаза или никаза Cas9.

[00346] Как описано в настоящем документе, применение РНК-направляемой ДНК-нуклеазы и направляющей РНК, описанных в настоящем документе, может привести к DSB, SSB и/или сайт-специфичному связыванию, что приводит к модификации нуклеиновой кислоты в ДНК или пре-мРНК, что может привести к ошибкам в форме вставных/делеционных (индел) мутаций при репарации клеточным механизмом. Многие мутации из-за вставок изменяют рамку считывания, вводят преждевременные стоп-кодоны или вызывают пропуск экзонов и, следовательно, производят нефункциональный белок.

[00347] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения эффективность конкретных направляющих РНК определяют на основе моделей in vitro. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения модель in vitro представляет собой Т-клеточную линию. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения модель in vitro представляет собой Т-клетки HEK293. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения модель in vitro представляет собой клетки HEK293, стабильно экспрессирующие Cas9 (HEK293_Cas9). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения модель in vitro представляет собой линию лимфобластоидных клеток. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения модель in vitro представляет собой первичные Т-клетки человека. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения модель in vitro представляет собой первичные В-клетки человека. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения модель in vitro представляет собой первичные лимфоциты периферической крови человека. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения модель in

vitro представляет собой первичные мононуклеарные клетки периферической крови человека.

[00348] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения количество нецелевых сайтов, в которых происходит делеция или вставка, в модели in vitro определяют, например, путем анализа геномной ДНК из клеток, трансфицированных in vitro мРНК Cas9 и направляющей РНК. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения такое определение включает анализ геномной ДНК клеток, трансфицированных in vitro мРНК Cas9, направляющей РНК и донорным олигонуклеотидом. Типичные процедуры для таких определений представлены в рабочих примерах ниже.

[00349] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения эффективность конкретных нРНК определяют на множестве клеточных моделей in vitro для процесса отбора направляющей РНК. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения проводят сравнение данных клеточной линии с выбранными направляющими РНК. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения выполняется перекрестный скрининг в нескольких моделях клеток.

[00350] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения эффективность конкретных направляющих РНК определяют на основе моделей in vivo. В некоторых вариантах осуществления модель in vivo представляет собой модель грызунов. В некоторых вариантах осуществления моделью грызунов является мышь, которая экспрессирует целевой ген. В некоторых вариантах осуществления моделью грызунов является мышь, которая экспрессирует ген CIITA. В некоторых вариантах осуществления моделью грызунов является мышь, которая экспрессирует ген CIITA человека. В некоторых вариантах осуществления моделью грызунов является мышь, которая экспрессирует ген B2M. В некоторых вариантах осуществления моделью грызунов является мышь, которая экспрессирует ген B2M человека. В некоторых вариантах осуществления модель in vivo представляет собой примата, отличного от человека, например яванского макака.

[00351] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения эффективность направляющей РНК оценивают по эффективности расщепления мишени. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения эффективность направляющей РНК измеряется процентным редактированием в целевом месте, *например*, CIITA или B2M. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения можно применять глубокое секвенирование для выявления наличия модификаций (*например*, вставок, делеций), внесенных в результате редактирования генов. Процент вставки может быть рассчитан из секвенирования следующего поколения «NGS».

[00352] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения эффективность направляющей РНК измеряют по количеству и/или частоте вставок в нецелевых последовательностях в геноме целевого типа клеток. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предусмотрены эффективные направляющие

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

[00353] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения линейная амплификация применяется для обнаружения событий редактирования генов, таких как образование инсерционных/делеционных («индел») мутаций, транслокаций и случаев направленной гомологии репарации (HDR) в целевой ДНК. Например, может быть применена линейная амплификация с уникальным праймером с меченной последовательностью и выделением меченых продуктов амплификации (далее именуемый как «UnIT» или «способ мечения уникальным идентификатором»).

[00354] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения эффективность РНК-направляемой измеряется количеством хромосомных перестроек в целевых клетках. Анализ хроматида dGH можно применять для обнаружения хромосомных перестроек, включая, например, транслокации, реципрокные транслокации, транслокации в нецелевые хромосомы, делеции (*т. е.* хромосомные перестройки, при которых фрагменты были потеряны во время цикла репликации клеток из-за случая редактирования). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения целевой тип клеток имеет менее 10, менее 8, менее 5, менее 4, менее 3, менее 2 или менее 1 хромосомной перестройки. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения тип целевой клетки не имеет хромосомных перестроек.

Доставка композиций нРНК

[00355] Липидные наночастицы (композиции LNP) являются хорошо известными средствами доставки нуклеотидного и белкового груза и могут быть применены для доставки РНК-направляемых, композиций или фармацевтических составов, описанных в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения

композиции LNP доставляют нуклеиновую кислоту, белок или нуклеиновую кислоту вместе с белком.

[00356] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения изобретение включает способ доставки любой из нРНК, описанных в настоящем документе, субъекту, при этом нРНК составлена как LNP. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения LNP содержит нРНК и Cas9 или мРНК, кодирующую Cas9.

[00357] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения изобретение включает композицию, содержащую любую из описанных нРНК и LNP. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения композиция дополнительно содержит Cas9 или мРНК, кодирующую Cas9.

[00358] В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения композиции LNP содержат катионные липиды. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения композиции LNP содержат (9Z,12Z)-3-((4,4-бис(октилокси)бутаноил)окси)-2-((((3-(диэтиламино)пропокси)карбонил)окси)метил) пропилоктадека-9,12-диеноат, также называемый 3-((4,4-бис(октилокси)бутаноил)окси)-2-((((3-(диэтиламино)пропокси)карбонил)окси)метил)пропил(9Z,12Z)-октадека-9,12-диеноат) или другой ионизируемый липид. См., например, липиды из WO/2017/173054 и ссылки, описанные в нем. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения композиции LNP содержат молярные соотношения катионного липидного амина к фосфату РНК (N:P) около 4,5, 5,0, 5,5, 6,0 или 6,5. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения термины «катионный» и «ионизируемый» в контексте липидов LNP являются взаимозаменяемыми, например, при этом ионизируемые липиды являются катионными в зависимости от pH.

[00359] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения нРНК, описанные в настоящем документе, составлены в виде композиций LNP для применения при приготовлении лекарственного средства для лечения заболевания или расстройства.

[00360] Электропорация является хорошо известным способом доставки груза, и любая методология электропорации может быть применена для доставки любой из нРНК, описанных в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения электропорация может быть применена для доставки любой из нРНК, описанных в настоящем документе, и Cas9 или мРНК, кодирующей Cas9.

[00361] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения изобретение включает способ доставки любой из нРНК, описанных в настоящем документе, в клетку ex vivo, при этом нРНК составлена как LNP или не составлена как LNP. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения LNP содержит нРНК и Cas9 или мРНК, кодирующую Cas9.

[00362] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения композиции направляющей РНК, описанные в настоящем документе, отдельно или закодированные на одном или большем количествам векторах, входят в состав липидных

наночастиц или вводятся через них; см., например, WO/2017/173054 и WO 2019/067992, содержание которых полностью включено в настоящее описание посредством ссылки.

[00363] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения изобретение включает векторы ДНК или РНК, кодирующие любую из направляющих РНК, содержащих любую одну или большее количество направляющих последовательностей, описанных в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения в дополнение к последовательностям направляющих РНК векторы дополнительно содержат нуклеиновые кислоты, которые не кодируют направляющие РНК. Нуклеиновые кислоты, которые не кодируют направляющие РНК, включают, помимо прочего, промоторы, энхансеры, регуляторные последовательности и нуклеиновые кислоты, кодирующие РНК-направляемую ДНК-нуклеазу, которая может представлять собой нуклеазу, такую как Cas9. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения вектор содержит одну или большее количество нуклеотидных последовательностей, кодирующих crРНК, trРНК или crРНК и trРНК. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения вектор содержит одну или большее количество нуклеотидных последовательностей, кодирующих онРНК и мРНК, кодирующую РНК-направляемую ДНК-нуклеазу, которая может представлять собой нуклеазу Cas, такую как Cas9 или Cpf1. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения вектор содержит одну или большее количество нуклеотидных последовательностей, кодирующих crРНК, trРНК и мРНК, кодирующую РНК-направляемую ДНК-нуклеазу, которая может представлять собой белок Cas, такой как Cas9. В одном варианте осуществления настоящего изобретения Cas9 получен из Streptococcus pyogenes (т.е. Cas9 Spy). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения нуклеотидная последовательность, кодирующая crРНК, trРНК или crРНК и trРНК (которая может представлять собой онРНК), содержит или состоит из направляющей последовательности, фланкированной полностью или частью повторяющейся последовательности из природной системы CRISPR/Cas. Нуклеиновая кислота, содержащая или состоящая из crРНК, trРНК или crРНК и trРНК, может дополнительно содержать векторную последовательность, при этом векторная последовательность содержит или состоит из нуклеиновых кислот, которые не встречаются в природе вместе с crРНК, trРНК или crРНК и trРНК.

Терапевтические способы и способы применения

[00364] Любые из сконструированных клеток и композиций, описанных в настоящем документе, можно применять в способе лечения различных заболеваний и нарушений, как описано в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения генетически модифицированная клетка (сконструированная клетка) и/или популяция генетически модифицированных клеток (сконструированная клетка) и композиции могут быть применены в способах лечения различных заболеваний и нарушений. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения охватывается способ лечения любого из заболеваний или нарушений, описанных в

настоящем документе, включающий введение любой одной или большего количества композиций, описанных в настоящем документе.

[00365] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения способы и композиции, описанные в настоящем документе, можно применять для лечения заболеваний или нарушений, требующих доставки терапевтического агента. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, изобретение обеспечивает способ обеспечения иммунотерапии у субъекта, причем способ включает введение субъекту эффективного количества сконструированной клетки (или популяции сконструированных клеток), как описано в настоящем документе, например, клетки любого из вышеупомянутых клеточных аспектов и варианты осуществления.

[00366] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения способы включают введение субъекту композиции, содержащей сконструированную клетку, описанную в настоящем документе, в качестве терапии на основе адоптивного переноса клеток. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения сконструированная клетка представляет собой аллогенную клетку.

[00367] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения способы включают введение субъекту композиции, содержащей сконструированную клетку, описанную в настоящем документе, при этом клетка продуцирует, секретирует и/или экспрессирует полипептид (например, нацеливающий рецептор), пригодный для лечения заболевания или расстройства в предмет. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения клетка действует как клеточная фабрика по производству растворимого полипептида. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения клетка действует как клеточная фабрика по производству антитела. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения клетка непрерывно секретирует полипептид in vivo. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения клетка непрерывно секретирует полипептид после трансплантации in vivo в течение по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5 или 6 недель. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения клетка непрерывно секретирует полипептид после трансплантации in vivo в течение более 6 недель. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения растворимый полипептид (*например*, антитело) продуцируется клеткой в концентрации по меньшей мере 10^2, 10^3, 10^4, 10^5, 10^6, 10^7 или 10^8 копий в день. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения полипептид представляет собой антитело и продуцируется клеткой в концентрации по меньшей мере 10^8 копий в день.

[00368] В некоторых вариантах осуществления способов, способ включает введение лимфодеплетирующего агента или иммунодепрессанта перед введением субъекту эффективного количества сконструированной клетки (или сконструированных клеток), как описано в настоящем документе, например, клетки любого из вышеупомянутых клеточных аспектов и вариантов осуществления. В другом аспекте

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

[00369] Иммунотерапия - это лечение заболевания путем активации или подавления иммунной системы. Иммунотерапия, предназначенная для индукции или усиления иммунного ответа, классифицируется как активационная иммунотерапия. Было продемонстрировано, что клеточная иммунотерапия эффективна при лечении некоторых видов рака. Иммунные эффекторные клетки, такие как лимфоциты, макрофаги, дендритные клетки, естественные клетки-киллеры, цитотоксические Т-лимфоциты (CTL), Т-хелперы, В-клетки или их предшественники, такие как гемопоэтические стволовые клетки (ГСК) или индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (iPSC) можно запрограммировать на действие в ответ на аномальные антигены, экспрессируемые на поверхности опухолевых клеток. Таким образом, иммунотерапия рака позволяет компонентам иммунной системы уничтожать опухоли или другие раковые клетки. Также было продемонстрировано, что клеточная иммунотерапия эффективна при лечении аутоиммунных заболеваний или отторжения трансплантата. Иммунные эффекторные клетки, такие как регуляторные Т-клетки (Treg) или мезенхимальные стволовые клетки, могут быть запрограммированы на действие в ответ на аутоантигены или антигены трансплантата, экспрессируемые на поверхности нормальных тканей.

[00370] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, изобретения относится к способу получения сконструированных клеток (*например*, популяции сконструированных клеток). Популяция сконструированных клеток может быть применена для иммунотерапии.

[00371] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, изобретение обеспечивает способ лечения субъекта, нуждающегося в этом, который включает введение сконструированных клеток, подготовленных описанным в настоящем документе способом получения клеток, например, способом любого из вышеупомянутых аспектов и вариантов осуществления способов получения клеток.

[00372] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения сконструированные клетки можно применять для лечения рака, инфекционных заболеваний, воспалительных заболеваний, аутоиммунных заболеваний, сердечно-сосудистых заболеваний, неврологических заболеваний, офтальмологических заболеваний, заболеваний почек, заболеваний печени, заболеваний опорно-двигательного аппарата, заболеваний эритроцитов или отторжения трансплантата.

[00373] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения сконструированные клетки можно применять в качестве клеточной терапии, включающей терапию аллогенными стволовыми клетками. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения клеточная терапия включает индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (iPSC). iPSC можно индуцировать для дифференцировки в другие типы клеток, включая, *например*, бета-островковые клетки, нейроны и клетки крови. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения клеточная терапия

включает гемопоэтические стволовые клетки. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения стволовые клетки содержат мезенхимальные стволовые клетки, которые могут развиваться в костные, хрящевые, мышечные и жировые клетки. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения стволовые клетки включают глазные стволовые клетки. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения аллогенная трансплантация стволовых клеток включает аллогенную трансплантацию костного мозга. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения стволовые клетки содержат плюрипотентные стволовые клетки (PSC). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения стволовые клетки включают индуцированные эмбриональные стволовые клетки (ESC).

[00374] Сконструированные клетки по данному изобретению подходят для дальнейшего конструирования, *например*, путем введения дополнительно отредактированных или модифицированных генов или аллелей. В некоторых вариантах осуществления полипептид представляет собой TCR дикого типа или его вариант. Клетки по изобретению также могут быть пригодны для дальнейшего конструирования путем введения экзогенной нуклеиновой кислоты, кодирующей, например, нацеливающий рецептор, *например*, TCR, CAR, UniCAR. CAR также известны как химерные иммунорецепторы, химерные рецепторы Т-клеток или искусственные рецепторы Т-клеток.

[00375] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения клеточная терапия представляет собой терапию трансгенными Т-клетками. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения клеточная терапия включает трансгенную Т-клетку, нацеленную на белок 1 опухоли Вильмса (WT1). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения клеточная терапия включает нацеливающий рецептор или донорную нуклеиновую кислоту, кодирующую нацеливающий рецептор коммерчески доступной Т-клеточной терапии, такой как CAR-Т-клеточная терапия. В настоящее время для клеточной терапии одобрен ряд нацеливающих рецепторов. Клетки и способы, предусмотренные в настоящем документе, можно применять с этими известными конструкциями. Коммерчески одобренные клеточные продукты, которые включают конструкции нацеливающих рецепторов для применения в качестве клеточной терапии, включают, *например*, Kymriah® (tisagenlecleucel); Yescarta® (axicabtagene ciloleucel); Tecartus™ (brexucabtagene autoleucel); Tabelecleucel (Tab-cel®); Viralym-M (ALVR105); и Viralym-C.

[00376] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения способы предусматривают введение сконструированных клеток субъекту, при этом введение представляет собой инъекцию. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения способы предусматривают введение сконструированных клеток субъекту, при этом введение представляет собой внутрисосудистую инъекцию или инфузию. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения способы предусматривают введение сконструированных клеток субъекту, при этом введение представляет собой

разовую дозу.

[00377] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения способы обеспечивают уменьшение признака или симптома, связанного с заболеванием субъекта, получающего лечение композицией, описанной в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения у субъекта наблюдается ответ на лечение описанной в настоящем документе композицией, который длится более одной недели. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения у субъекта наблюдается ответ на лечение описанной в настоящем документе композицией, который длится более двух недель. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения у субъекта наблюдается ответ на лечение описанной в настоящем документе композицией, который длится более трех недель. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения у субъекта наблюдается ответ на лечение описанной в настоящем документе композицией, который длится более одного месяца.

[00378] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения способы предусматривают введение сконструированных клеток субъекту, при этом у субъекта наблюдается ответ на введенную клетку, который включает уменьшение признака или симптома, связанного с заболеванием, которое лечится клеточной терапией. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения у субъекта наблюдается ответ, который длится более одной недели. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения у субъекта наблюдается ответ, который длится более одного месяца. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения у субъекта наблюдается ответ, который длится по меньшей мере 1-6 недель.

[00379] **Таблица 4. ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ**

Описание	**SEQ ID NO**	**Последовательность**
G000644	200	mG*mA*mG*UCCGAGCAGAAGAAGAAGUUUUAGAmGmCmU mAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUC CGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmC mAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
G000645	201	mG*mA*mC*CCCCUCCACCCCGCCUCGUUUUAGAmGmCmU mAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUC CGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmC mAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
G000646	202	mG*mA*mC*UUGUUUUCAUUGUUCUCGUUUUAGAmGmCmU mAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUC CGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmC mAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU

G013006	203	mC*mU*mC*UCAGCUGGUACACGGCAGUUUUAGAmGmCmU mAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUC CGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmC mAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
G013009	204	mU*mA*mG*GCAGACAGACUUGUCACGUUUUAGAmGmCmU mAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUC CGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmC mAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
G015964	205	mC*mC*mC*CCCGCCGUGUUUGUGGGGUUUUAGAmGmCmU mAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUC CGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmC mAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
G015991	206	mA*mC*mU*CACGCUGGAUAGCCUCCGUUUUAGAmGmCmU mAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUC CGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmC mAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
G015995	207	mU*mU*mA*CCCCACUUAACUAUCUUGUUUUAGAmGmCmU mAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUC CGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmC mAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
G015996	208	mC*mU*mU*ACCCCACUUAACUAUCUGUUUUAGAmGmCmU mAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUC CGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmC mAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
G016016	209	mU*mU*mU*CAAAACCUGUCAGUGAUGUUUUAGAmGmCmU mAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUC CGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmC mAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
G016017	210	mU*mU*mC*AAAACCUGUCAGUGAUUGUUUUAGAmGmCmU mAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUC CGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmC mAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
G016239	211	mG*mG*mC*CUCGGCGCUGACGAUCUGUUUUAGAmGmCmU mAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUC

		CGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmC mAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
G018081	212	mC*mU*mG*UGUCACCCGUUUCAGGUGUUUUAGAmGmCmU mAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUC CGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmC mAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
G018082	213	mU*mG*mU*GUCACCCGUUUCAGGUGGUUUUAGAmGmCmU mAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUC CGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmC mAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
G018995	214	mA*mC*mA*GCGACGCCGCGAGCCAGGUUUUAGAmGmCmU mAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUC CGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmC mAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
tracr РНК	215	AACAGCAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCA ACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUUUUU
G000529	216	mG*mG*mC*CACGGAGCGAGACAUCUGUUUUAGAmGmCmU mAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUC CGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmC mAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
G019000	217	mG*mC*mG*CCCGCGGCUCCAUCCUCGUUUUAGAmGmCmU mAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUC CGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmC mAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
Аминокислотная последовательность рекомбинантного Cas9-NLS	800	MDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSI KKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFS NEMAKVDDSFFHRLEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHE KYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLALAHMIKFRGHFLIEGDL NPDNSDVDKLFQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSK SRRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDA KLQLSKDTYDDDLDNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDI LRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYK EIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVK

		LNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYPFLKDN REKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEE VVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYFTVYNE LTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLK EDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDN EENEDILEDIVLTLTLFEDREMIEERLKTYAHLFDDKVMKQLK RRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANRNFMQ LIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGILQ TVKVVDELVKVMGRHKPENIVIEMARENQTTQKGQKNSRER MKRIEEGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMY VDQELDINRLSDYDVDHIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGK SDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGG LSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLI REVKVITLKSKLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNAV VGTALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMIAKSEQEIGKATA KYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGR DFATVRKVLSMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIA RKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKVEKGKSKKLKSVKE LLGITIMERSSFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELE NGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGSP EDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVILADANLDKVLSA YNKHRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYT STKEVLDATLIHQSITGLYETRIDLSQLGGDGGGSPKKKRKV
ORF, кодирующая Sp. Cas9	801	ATGGACAAGAAGTACAGCATCGGACTGGACATCGGAACAA ACAGCGTCGGATGGGCAGTCATCACAGACGAATACAAGGT CCCGAGCAAGAAGTTCAAGGTCCTGGGAAACACAGACAGA CACAGCATCAAGAAGAACCTGATCGGAGCACTGCTGTTCGA CAGCGGAGAAACAGCAGAAGCAACAAGACTGAAGAGAACA GCAAGAAGAAGATACACAAGAAGAAAGAACAGAATCTGCT ACCTGCAGGAAATCTTCAGCAACGAAATGGCAAAGGTCGA CGACAGCTTCTTCCACAGACTGGAAGAAAGCTTCCTGGTCG AAGAAGACAAGAAGCACGAAAGACACCCGATCTTCGGAAA CATCGTCGACGAAGTCGCATACCACGAAAAGTACCCGACAA TCTACCACCTGAGAAAGAAGCTGGTCGACAGCACAGACAA GGCAGACCTGAGACTGATCTACCTGGCACTGGCACACATGA

		TCAAGTTCAGAGGACACTTCCTGATCGAAGGAGACCTGAAC CCGGACAACAGCGACGTCGACAAGCTGTTCATCCAGCTGGT CCAGACATACAACCAGCTGTTCGAAGAAAACCCGATCAACG CAAGCGGAGTCGACGCAAAGGCAATCCTGAGCGCAAGACT GAGCAAGAGCAGAAGACTGGAAAACCTGATCGCACAGCTG CCGGGAGAAAAGAAGAACGGACTGTTCGGAAACCTGATCG CACTGAGCCTGGGACTGACACCGAACTTCAAGAGCAACTTC GACCTGGCAGAAGACGCAAAGCTGCAGCTGAGCAAGGACA CATACGACGACGACCTGGACAACCTGCTGGCACAGATCGGA GACCAGTACGCAGACCTGTTCCTGGCAGCAAAGAACCTGAG CGACGCAATCCTGCTGAGCGACATCCTGAGAGTCAACACAG AAATCACAAAGGCACCGCTGAGCGCAAGCATGATCAAGAG ATACGACGAACACCACCAGGACCTGACACTGCTGAAGGCA CTGGTCAGACAGCAGCTGCCGGAAAAGTACAAGGAAATCTT CTTCGACCAGAGCAAGAACGGATACGCAGGATACATCGAC GGAGGAGCAAGCCAGGAAGAATTCTACAAGTTCATCAAGC CGATCCTGGAAAAGATGGACGGAACAGAAGAACTGCTGGT CAAGCTGAACAGAGAAGACCTGCTGAGAAAGCAGAGAACA TTCGACAACGGAAGCATCCCGCACCAGATCCACCTGGGAGA ACTGCACGCAATCCTGAGAAGACAGGAAGACTTCTACCCGT TCCTGAAGGACAACAGAGAAAAGATCGAAAAGATCCTGAC ATTCAGAATCCCGTACTACGTCGGACCGCTGGCAAGAGGAA ACAGCAGATTCGCATGGATGACAAGAAAGAGCGAAGAAAC AATCACACCGTGGAACTTCGAAGAAGTCGTCGACAAGGGA GCAAGCGCACAGAGCTTCATCGAAAGAATGACAAACTTCG ACAAGAACCTGCCGAACGAAAAGGTCCTGCCGAAGCACAG CCTGCTGTACGAATACTTCACAGTCTACAACGAACTGACAA AGGTCAAGTACGTCACAGAAGGAATGAGAAAGCCGGCATT CCTGAGCGGAGAACAGAAGAAGGCAATCGTCGACCTGCTG TTCAAGACAAACAGAAAGGTCACAGTCAAGCAGCTGAAGG AAGACTACTTCAAGAAGATCGAATGCTTCGACAGCGTCGAA ATCAGCGGAGTCGAAGACAGATTCAACGCAAGCCTGGGAA CATACCACGACCTGCTGAAGATCATCAAGGACAAGGACTTC CTGGACAACGAAGAAAACGAAGACATCCTGGAAGACATCG TCCTGACACTGACACTGTTCGAAGACAGAGAAATGATCGAA

		GAAAGACTGAAGACATACGCACACCTGTTCGACGACAAGG
		TCATGAAGCAGCTGAAGAGAAGAAGATACACAGGATGGGG
		AAGACTGAGCAGAAAGCTGATCAACGGAATCAGAGACAAG
		CAGAGCGGAAAGACAATCCTGGACTTCCTGAAGAGCGACG
		GATTCGCAAACAGAAACTTCATGCAGCTGATCCACGACGAC
		AGCCTGACATTCAAGGAAGACATCCAGAAGGCACAGGTCA
		GCGGACAGGGAGACAGCCTGCACGAACACATCGCAAACCT
		GGCAGGAAGCCCGGCAATCAAGAAGGGAATCCTGCAGACA
		GTCAAGGTCGTCGACGAACTGGTCAAGGTCATGGGAAGAC
		ACAAGCCGGAAAACATCGTCATCGAAATGGCAAGAGAAAA
		CCAGACAACACAGAAGGGACAGAAGAACAGCAGAGAAAG
		AATGAAGAGAATCGAAGAAGGAATCAAGGAACTGGGAAGC
		CAGATCCTGAAGGAACACCCGGTCGAAAACACACAGCTGC
		AGAACGAAAAGCTGTACCTGTACTACCTGCAGAACGGAAG
		AGACATGTACGTCGACCAGGAACTGGACATCAACAGACTG
		AGCGACTACGACGTCGACCACATCGTCCCGCAGAGCTTCCT
		GAAGGACGACAGCATCGACAACAAGGTCCTGACAAGAAGC
		GACAAGAACAGAGGAAAGAGCGACAACGTCCCGAGCGAAG
		AAGTCGTCAAGAAGATGAAGAACTACTGGAGACAGCTGCT
		GAACGCAAAGCTGATCACACAGAGAAAGTTCGACAACCTG
		ACAAAGGCAGAGAGAGGAGGACTGAGCGAACTGGACAAGG
		CAGGATTCATCAAGAGACAGCTGGTCGAAACAAGACAGAT
		CACAAAGCACGTCGCACAGATCCTGGACAGCAGAATGAAC
		ACAAAGTACGACGAAAACGACAAGCTGATCAGAGAAGTCA
		AGGTCATCACACTGAAGAGCAAGCTGGTCAGCGACTTCAGA
		AAGGACTTCCAGTTCTACAAGGTCAGAGAAATCAACAACTA
		CCACCACGCACACGACGCATACCTGAACGCAGTCGTCGGAA
		CAGCACTGATCAAGAAGTACCCGAAGCTGGAAAGCGAATT
		CGTCTACGGAGACTACAAGGTCTACGACGTCAGAAAGATGA
		TCGCAAAGAGCGAACAGGAAATCGGAAAGGCAACAGCAAA
		GTACTTCTTCTACAGCAACATCATGAACTTCTTCAAGACAG
		AAATCACACTGGCAAACGGAGAAATCAGAAAGAGACCGCT
		GATCGAAACAAACGGAGAAACAGGAGAAATCGTCTGGGAC
		AAGGGAAGAGACTTCGCAACAGTCAGAAAGGTCCTGAGCA
		TGCCGCAGGTCAACATCGTCAAGAAGACAGAAGTCCAGAC

		AGGAGGATTCAGCAAGGAAAGCATCCTGCCGAAGAGAAAC AGCGACAAGCTGATCGCAAGAAAGAAGGACTGGGACCCGA AGAAGTACGGAGGATTCGACAGCCCGACAGTCGCATACAG CGTCCTGGTCGTCGCAAAGGTCGAAAAGGGAAAGAGCAAG AAGCTGAAGAGCGTCAAGGAACTGCTGGGAATCACAATCA TGGAAAGAAGCAGCTTCGAAAAGAACCCGATCGACTTCCTG GAAGCAAAGGGATACAAGGAAGTCAAGAAGGACCTGATCA TCAAGCTGCCGAAGTACAGCCTGTTCGAACTGGAAAACGGA AGAAAGAGAATGCTGGCAAGCGCAGGAGAACTGCAGAAGG GAAACGAACTGGCACTGCCGAGCAAGTACGTCAACTTCCTG TACCTGGCAAGCCACTACGAAAAGCTGAAGGGAAGCCCGG AAGACAACGAACAGAAGCAGCTGTTCGTCGAACAGCACAA GCACTACCTGGACGAAATCATCGAACAGATCAGCGAATTCA GCAAGAGAGTCATCCTGGCAGACGCAAACCTGGACAAGGT CCTGAGCGCATACAACAAGCACAGAGACAAGCCGATCAGA GAACAGGCAGAAAACATCATCCACCTGTTCACACTGACAAA CCTGGGAGCACCGGCAGCATTCAAGTACTTCGACACAACAA TCGACAGAAAGAGATACACAAGCACAAAGGAAGTCCTGGA CGCAACACTGATCCACCAGAGCATCACAGGACTGTACGAAA CAAGAATCGACCTGAGCCAGCTGGGAGGAGACGGAGGAGG AAGCCCGAAGAAGAAGAGAAAGGTCTAG
ORF, кодирующая Sp. Cas9	802	ATGGACAAGAAGTACTCCATCGGCCTGGACATCGGCACCAA CTCCGTGGGCTGGGCCGTGATCACCGACGAGTACAAGGTGC CCTCCAAGAAGTTCAAGGTGCTGGGCAACACCGACCGGCAC TCCATCAAGAAGAACCTGATCGGCGCCCTGCTGTTCGACTC CGGCGAGACCGCCGAGGCCACCCGGCTGAAGCGGACCGCC CGGCGGCGGTACACCCGGCGGAAGAACCGGATCTGCTACCT GCAGGAGATCTTCTCCAACGAGATGGCCAAGGTGGACGACT CCTTCTTCCACCGGCTGGAGGAGTCCTTCCTGGTGGAGGAG GACAAGAAGCACGAGCGGCACCCCATCTTCGGCAACATCGT GGACGAGGTGGCCTACCACGAGAAGTACCCCACCATCTACC ACCTGCGGAAGAAGCTGGTGGACTCCACCGACAAGGCCGA CCTGCGGCTGATCTACCTGGCCCTGGCCCACATGATCAAGT TCCGGGGCCACTTCCTGATCGAGGGCGACCTGAACCCCGAC AACTCCGACGTGGACAAGCTGTTCATCCAGCTGGTGCAGAC

		CTACAACCAGCTGTTCGAGGAGAACCCCATCAACGCCTCCG GCGTGGACGCCAAGGCCATCCTGTCCGCCCGGCTGTCCAAG TCCCGGCGGCTGGAGAACCTGATCGCCCAGCTGCCCGGCGA GAAGAAGAACGGCCTGTTCGGCAACCTGATCGCCCTGTCCC TGGGCCTGACCCCCAACTTCAAGTCCAACTTCGACCTGGCC GAGGACGCCAAGCTGCAGCTGTCCAAGGACACCTACGACG ACGACCTGGACAACCTGCTGGCCCAGATCGGCGACCAGTAC GCCGACCTGTTCCTGGCCGCCAAGAACCTGTCCGACGCCAT CCTGCTGTCCGACATCCTGCGGGTGAACACCGAGATCACCA AGGCCCCCCTGTCCGCCTCCATGATCAAGCGGTACGACGAG CACCACCAGGACCTGACCCTGCTGAAGGCCCTGGTGCGGCA GCAGCTGCCCGAGAAGTACAAGGAGATCTTCTTCGACCAGT CCAAGAACGGCTACGCCGGCTACATCGACGGCGGCGCCTCC CAGGAGGAGTTCTACAAGTTCATCAAGCCCATCCTGGAGAA GATGGACGGCACCGAGGAGCTGCTGGTGAAGCTGAACCGG GAGGACCTGCTGCGGAAGCAGCGGACCTTCGACAACGGCTC CATCCCCCACCAGATCCACCTGGGCGAGCTGCACGCCATCC TGCGGCGGCAGGAGGACTTCTACCCCTTCCTGAAGGACAAC CGGGAGAAGATCGAGAAGATCCTGACCTTCCGGATCCCCTA CTACGTGGGCCCCCTGGCCCGGGGCAACTCCCGGTTCGCCT GGATGACCCGGAAGTCCGAGGAGACCATCACCCCCTGGAA CTTCGAGGAGGTGGTGGACAAGGGCGCCTCCGCCCAGTCCT TCATCGAGCGGATGACCAACTTCGACAAGAACCTGCCCAAC GAGAAGGTGCTGCCCAAGCACTCCCTGCTGTACGAGTACTT CACCGTGTACAACGAGCTGACCAAGGTGAAGTACGTGACCG AGGGCATGCGGAAGCCCGCCTTCCTGTCCGGCGAGCAGAAG AAGGCCATCGTGGACCTGCTGTTCAAGACCAACCGGAAGGT GACCGTGAAGCAGCTGAAGGAGGACTACTTCAAGAAGATC GAGTGCTTCGACTCCGTGGAGATCTCCGGCGTGGAGGACCG GTTCAACGCCTCCCTGGGCACCTACCACGACCTGCTGAAGA TCATCAAGGACAAGGACTTCCTGGACAACGAGGAGAACGA GGACATCCTGGAGGACATCGTGCTGACCCTGACCCTGTTCG AGGACCGGGAGATGATCGAGGAGCGGCTGAAGACCTACGC CCACCTGTTCGACGACAAGGTGATGAAGCAGCTGAAGCGGC GGCGGTACACCGGCTGGGGCCGGCTGTCCCGGAAGCTGATC

		AACGGCATCCGGGACAAGCAGTCCGGCAAGACCATCCTGG
		ACTTCCTGAAGTCCGACGGCTTCGCCAACCGGAACTTCATG
		CAGCTGATCCACGACGACTCCCTGACCTTCAAGGAGGACAT
		CCAGAAGGCCCAGGTGTCCGGCCAGGGCGACTCCCTGCACG
		AGCACATCGCCAACCTGGCCGGCTCCCCCGCCATCAAGAAG
		GGCATCCTGCAGACCGTGAAGGTGGTGGACGAGCTGGTGA
		AGGTGATGGGCCGGCACAAGCCCGAGAACATCGTGATCGA
		GATGGCCCGGGAGAACCAGACCACCCAGAAGGGCCAGAAG
		AACTCCCGGGAGCGGATGAAGCGGATCGAGGAGGGCATCA
		AGGAGCTGGGCTCCCAGATCCTGAAGGAGCACCCCGTGGA
		GAACACCCAGCTGCAGAACGAGAAGCTGTACCTGTACTACC
		TGCAGAACGGCCGGGACATGTACGTGGACCAGGAGCTGGA
		CATCAACCGGCTGTCCGACTACGACGTGGACCACATCGTGC
		CCCAGTCCTTCCTGAAGGACGACTCCATCGACAACAAGGTG
		CTGACCCGGTCCGACAAGAACCGGGGCAAGTCCGACAACG
		TGCCCTCCGAGGAGGTGGTGAAGAAGATGAAGAACTACTG
		GCGGCAGCTGCTGAACGCCAAGCTGATCACCCAGCGGAAGT
		TCGACAACCTGACCAAGGCCGAGCGGGGCGGCCTGTCCGA
		GCTGGACAAGGCCGGCTTCATCAAGCGGCAGCTGGTGGAG
		ACCCGGCAGATCACCAAGCACGTGGCCCAGATCCTGGACTC
		CCGGATGAACACCAAGTACGACGAGAACGACAAGCTGATC
		CGGGAGGTGAAGGTGATCACCCTGAAGTCCAAGCTGGTGTC
		CGACTTCCGGAAGGACTTCCAGTTCTACAAGGTGCGGGAGA
		TCAACAACTACCACCACGCCCACGACGCCTACCTGAACGCC
		GTGGTGGGCACCGCCCTGATCAAGAAGTACCCCAAGCTGGA
		GTCCGAGTTCGTGTACGGCGACTACAAGGTGTACGACGTGC
		GGAAGATGATCGCCAAGTCCGAGCAGGAGATCGGCAAGGC
		CACCGCCAAGTACTTCTTCTACTCCAACATCATGAACTTCTT
		CAAGACCGAGATCACCCTGGCCAACGGCGAGATCCGGAAG
		CGGCCCCTGATCGAGACCAACGGCGAGACCGGCGAGATCG
		TGTGGGACAAGGGCCGGGACTTCGCCACCGTGCGGAAGGT
		GCTGTCCATGCCCCAGGTGAACATCGTGAAGAAGACCGAGG
		TGCAGACCGGCGGCTTCTCCAAGGAGTCCATCCTGCCCAAG
		CGGAACTCCGACAAGCTGATCGCCCGGAAGAAGGACTGGG
		ACCCCAAGAAGTACGGCGGCTTCGACTCCCCCACCGTGGCC

		TACTCCGTGCTGGTGGTGGCCAAGGTGGAGAAGGGCAAGTC CAAGAAGCTGAAGTCCGTGAAGGAGCTGCTGGGCATCACC ATCATGGAGCGGTCCTCCTTCGAGAAGAACCCCATCGACTT CCTGGAGGCCAAGGGCTACAAGGAGGTGAAGAAGGACCTG ATCATCAAGCTGCCCAAGTACTCCCTGTTCGAGCTGGAGAA CGGCCGGAAGCGGATGCTGGCCTCCGCCGGCGAGCTGCAG AAGGGCAACGAGCTGGCCCTGCCCTCCAAGTACGTGAACTT CCTGTACCTGGCCTCCCACTACGAGAAGCTGAAGGGCTCCC CCGAGGACAACGAGCAGAAGCAGCTGTTCGTGGAGCAGCA CAAGCACTACCTGGACGAGATCATCGAGCAGATCTCCGAGT TCTCCAAGCGGGTGATCCTGGCCGACGCCAACCTGGACAAG GTGCTGTCCGCCTACAACAAGCACCGGGACAAGCCCATCCG GGAGCAGGCCGAGAACATCATCCACCTGTTCACCCTGACCA ACCTGGGCGCCCCCGCCGCCTTCAAGTACTTCGACACCACC ATCGACCGGAAGCGGTACACCTCCACCAAGGAGGTGCTGG ACGCCACCCTGATCCACCAGTCCATCACCGGCCTGTACGAG ACCCGGATCGACCTGTCCCAGCTGGGCGGCGACGGCGGCGG CTCCCCCAAGAAGAAGCGGAAGGTGTGA
Открытая рамка считывания Cas9 с меткой Hibit	803	AUGGACAAGAAGUACUCCAUCGGCCUGGACAUCGGCACCA ACUCCGUGGGCUGGGCCGUGAUCACCGACGAGUACAAGGU GCCCUCCAAGAAGUUCAAGGUGCUGGGCAACACCGACCGG CACUCCAUCAAGAAGAACCUGAUCGGCGCCCUGCUGUUCG ACUCCGGCGAGACCGCCGAGGCCACCCGGCUGAAGCGGAC CGCCCGGCGGCGGUACACCCGGCGGAAGAACCGGAUCUGC UACCUGCAGGAGAUCUUCUCCAACGAGAUGGCCAAGGUGG ACGACUCCUUCUUCCACCGGCUGGAGGAGUCCUUCCUGGU GGAGGAGGACAAGAAGCACGAGCGGCACCCCAUCUUCGGC AACAUCGUGGACGAGGUGGCCUACCACGAGAAGUACCCCA CCAUCUACCACCUGCGGAAGAAGCUGGUGGACUCCACCGA CAAGGCCGACCUGCGGCUGAUCUACCUGGCCCUGGCCCAC AUGAUCAAGUUCCGGGGCCACUUCCUGAUCGAGGGCGACC UGAACCCCGACAACUCCGACGUGGACAAGCUGUUCAUCCA GCUGGUGCAGACCUACAACCAGCUGUUCGAGGAGAACCCC AUCAACGCCUCCGGCGUGGACGCCAAGGCCAUCCUGUCCG CCCGGCUGUCCAAGUCCCGGCGGCUGGAGAACCUGAUCGC

		CCAGCUGCCCGGCGAGAAGAAGAACGGCCUGUUCGGCAAC CUGAUCGCCCUGUCCCUGGGCCUGACCCCCAACUUCAAGU CCAACUUCGACCUGGCCGAGGACGCCAAGCUGCAGCUGUC CAAGGACACCUACGACGACGACCUGGACAACCUGCUGGCC CAGAUCGGCGACCAGUACGCCGACCUGUUCCUGGCCGCCA AGAACCUGUCCGACGCCAUCCUGCUGUCCGACAUCCUGCG GGUGAACACCGAGAUCACCAAGGCCCCCCUGUCCGCCUCC AUGAUCAAGCGGUACGACGAGCACCACCAGGACCUGACCC UGCUGAAGGCCCUGGUGCGGCAGCAGCUGCCCGAGAAGUA CAAGGAGAUCUUCUUCGACCAGUCCAAGAACGGCUACGCC GGCUACAUCGACGGCGGCGCCUCCCAGGAGGAGUUCUACA AGUUCAUCAAGCCCAUCCUGGAGAAGAUGGACGGCACCGA GGAGCUGCUGGUGAAGCUGAACCGGGAGGACCUGCUGCG GAAGCAGCGGACCUUCGACAACGGCUCCAUCCCCCACCAG AUCCACCUGGGCGAGCUGCACGCCAUCCUGCGGCGGCAGG AGGACUUCUACCCCUUCCUGAAGGACAACCGGGAGAAGAU CGAGAAGAUCCUGACCUUCCGGAUCCCCUACUACGUGGGC CCCCUGGCCCGGGGCAACUCCCGGUUCGCCUGGAUGACCC GGAAGUCCGAGGAGACCAUCACCCCCUGGAACUUCGAGGA GGUGGUGGACAAGGGCGCCUCCGCCCAGUCCUUCAUCGAG CGGAUGACCAACUUCGACAAGAACCUGCCCAACGAGAAGG UGCUGCCCAAGCACUCCCUGCUGUACGAGUACUUCACCGU GUACAACGAGCUGACCAAGGUGAAGUACGUGACCGAGGG CAUGCGGAAGCCCGCCUUCCUGUCCGGCGAGCAGAAGAAG GCCAUCGUGGACCUGCUGUUCAAGACCAACCGGAAGGUGA CCGUGAAGCAGCUGAAGGAGGACUACUUCAAGAAGAUCG AGUGCUUCGACUCCGUGGAGAUCUCCGGCGUGGAGGACCG GUUCAACGCCUCCCCUGGGCACCUACCACGACCUGCUGAAG AUCAUCAAGGACAAGGACUUCCUGGACAACGAGGAGAAC GAGGACAUCCUGGAGGACAUCGUGCUGACCCUGACCCUGU UCGAGGACCGGGAGAUGAUCGAGGAGCGGCUGAAGACCU ACGCCCACCUGUUCGACGACAAGGUGAUGAAGCAGCUGAA GCGGCGGCGGUACACCGGCUGGGGCCGGCUGUCCCGGAAG CUGAUCAACGGCAUCCGGGACAAGCAGUCCGGCAAGACCA UCCUGGACUUCCUGAAGUCCGACGGCUUCGCCAACCGGAA

		CUUCAUGCAGCUGAUCCACGACGACUCCCUGACCUUCAAG
		GAGGACAUCCAGAAGGCCCAGGUGUCCGGCCAGGGCGACU
		CCCUGCACGAGCACAUCGCCAACCUGGCCGGCUCCCCCGC
		CAUCAAGAAGGGCAUCCUGCAGACCGUGAAGGUGGUGGA
		CGAGCUGGUGAAGGUGAUGGGCCGGCACAAGCCCGAGAAC
		AUCGUGAUCGAGAUGGCCCGGGAGAACCAGACCACCCAGA
		AGGGCCAGAAGAACUCCCGGGAGCGGAUGAAGCGGAUCG
		AGGAGGGCAUCAAGGAGCUGGGCUCCCAGAUCCUGAAGG
		AGCACCCCGUGGAGAACACCCAGCUGCAGAACGAGAAGCU
		GUACCUGUACUACCUGCAGAACGGCCGGGACAUGUACGUG
		GACCAGGAGCUGGACAUCAACCGGCUGUCCGACUACGACG
		UGGACCACAUCGUGCCCCAGUCCUUCCUGAAGGACGACUC
		CAUCGACAACAAGGUGCUGACCCGGUCCGACAAGAACCGG
		GGCAAGUCCGACAACGUGCCCUCCGAGGAGGUGGUGAAGA
		AGAUGAAGAACUACUGGCGGCAGCUGCUGAACGCCAAGCU
		GAUCACCCAGCGGAAGUUCGACAACCUGACCAAGGCCGAG
		CGGGGCGGCCUGUCCGAGCUGGACAAGGCCGGCUUCAUCA
		AGCGGCAGCUGGUGGAGACCCGGCAGAUCACCAAGCACGU
		GGCCCAGAUCCUGGACUCCCGGAUGAACACCAAGUACGAC
		GAGAACGACAAGCUGAUCCGGGAGGUGAAGGUGAUCACC
		CUGAAGUCCAAGCUGGUGUCCGACUUCCGGAAGGACUUCC
		AGUUCUACAAGGUGCGGGAGAUCAACAACUACCACCACGC
		CCACGACGCCUACCUGAACGCCGUGGUGGGCACCGCCCUG
		AUCAAGAAGUACCCCAAGCUGGAGUCCGAGUUCGUGUACG
		GCGACUACAAGGUGUACGACGUGCGGAAGAUGAUCGCCA
		AGUCCGAGCAGGAGAUCGGCAAGGCCACCGCCAAGUACUU
		CUUCUACUCCAACAUCAUGAACUUCUUCAAGACCGAGAUC
		ACCCUGGCCAACGGCGAGAUCCGGAAGCGGCCCCUGAUCG
		AGACCAACGGCGAGACCGGCGAGAUCGUGUGGGACAAGG
		GCCGGGACUUCGCCACCGUGCGGAAGGUGCUGUCCAUGCC
		CCAGGUGAACAUCGUGAAGAAGACCGAGGUGCAGACCGGC
		GGCUUCUCCAAGGAGUCCAUCCUGCCCAAGCGGAACUCCG
		ACAAGCUGAUCGCCCGGAAGAAGGACUGGGACCCCAAGAA
		GUACGGCGGCUUCGACUCCCCCACCGUGGCCUACUCCGUG
		CUGGUGGUGGCCAAGGUGGAGAAGGGCAAGUCCAAGAAG

		CUGAAGUCCGUGAAGGAGCUGCUGGGCAUCACCAUCAUGG AGCGGUCCUCCUUCGAGAAGAACCCCAUCGACUUCCUGGA GGCCAAGGGCUACAAGGAGGUGAAGAAGGACCUGAUCAU CAAGCUGCCCAAGUACUCCCUGUUCGAGCUGGAGAACGGC CGGAAGCGGAUGCUGGCCUCCGCCGGCGAGCUGCAGAAGG GCAACGAGCUGGCCCUGCCCUCCAAGUACGUGAACUUCCU GUACCUGGCCUCCCACUACGAGAAGCUGAAGGGCUCCCCC GAGGACAACGAGCAGAAGCAGCUGUUCGUGGAGCAGCAC AAGCACUACCUGGACGAGAUCAUCGAGCAGAUCUCCGAGU UCUCCAAGCGGGUGAUCCUGGCCGACGCCAACCUGGACAA GGUGCUGUCCGCCUACAACAAGCACCGGGACAAGCCCAUC CGGGAGCAGGCCGAGAACAUCAUCCACCUGUUCACCCUGA CCAACCUGGGCGCCCCCGCCGCCUUCAAGUACUUCGACAC CACCAUCGACCGGAAGCGGUACACCUCCACCAAGGAGGUG CUGGACGCCACCCUGAUCCACCAGUCCAUCACCGGCCUGU ACGAGACCCGGAUCGACCUGUCCCAGCUGGGCGGCGACGG CGGCGGCUCCCCCAAGAAGAAGCGGAAGGUGUCCGAGUCC GCCACCCCCGAGUCCGUGUCCGGCUGGCGGCUGUUCAAGA AGAUCUCCUGA
Открытая рамка считывания BC22n	804	AUGGAGGCCUCCCCCGCCUCCGGCCCCCGGCACCUGAUGG ACCCCCACAUCUUCACCUCCAACUUCAACAACGGCAUCGG CCGGCACAAGACCUACCUGUGCUACGAGGUGGAGCGGCUG GACAACGGCACCUCCGUGAAGAUGGACCAGCACCGGGGCU UCCUGCACAACCAGGCCAAGAACCUGCUGUGCGGCUUCUA CGGCCGGCACGCCGAGCUGCGGUUCCUGGACCUGGUGCCC UCCCUGCAGCUGGACCCCGCCCAGAUCUACCGGGUGACCU GGUUCAUCUCCUGGUCCCCCUGCUUCUCCUGGGGCUGCGC CGGCGAGGUGCGGGCCUUCCUGCAGGAGAACACCCACGUG CGGCUGCGGAUCUUCGCCGCCCGGAUCUACGACUACGACC CCCUGUACAAGGAGGCCCUGCAGAUGCUGCGGGACGCCGG CGCCCAGGUGUCCAUCAUGACCUACGACGAGUUCAAGCAC UGCUGGGACACCUUCGUGGACCACCAGGGCUGCCCCUUCC AGCCCUGGGACGGCCUGGACGAGCACUCCCAGGCCCUGUC CGGCCGGCUGCGGGCCAUCCUGCAGAACCAGGGCAACUCC GGCUCCGAGACCCCCGGCACCUCCGAGUCCGCCACCCCCG

		AGUCCGACAAGAAGUACUCCAUCGGCCUGGCCAUCGGCAC CAACUCCGUGGGCUGGGCCGUGAUCACCGACGAGUACAAG GUGCCCUCCAAGAAGUUCAAGGUGCUGGGCAACACCGACC GGCACUCCAUCAAGAAGAACCUGAUCGGCGCCCUGCUGUU CGACUCCGGCGAGACCGCCGAGGCCACCCGGCUGAAGCGG ACCGCCCGGCGGCGGUACACCCGGCGGAAGAACCGGAUCU GCUACCUGCAGGAGAUCUUCUCCAACGAGAUGGCCAAGGU GGACGACUCCUUCUUCCACCGGCUGGAGGAGUCCUUCCUG GUGGAGGAGGACAAGAAGCACGAGCGGCACCCCAUCUUCG GCAACAUCGUGGACGAGGUGGCCUACCACGAGAAGUACCC CACCAUCUACCACCUGCGGAAGAAGCUGGUGGACUCCACC GACAAGGCCGACCUGCGGCUGAUCUACCUGGCCCUGGCCC ACAUGAUCAAGUUCCGGGGCCACUUCCUGAUCGAGGGCGA CCUGAACCCCGACAACUCCGACGUGGACAAGCUGUUCAUC CAGCUGGUGCAGACCUACAACCAGCUGUUCGAGGAGAACC CCAUCAACGCCUCCGGCGUGGACGCCAAGGCCAUCCUGUC CGCCCGGCUGUCCAAGUCCCGGCGGCUGGAGAACCUGAUC GCCCAGCUGCCCGGCGAGAAGAAGAACGGCCUGUUCGGCA ACCUGAUCGCCCUGUCCCUGGGCCUGACCCCCAACUUCAA GUCCAACUUCGACCUGGCCGAGGACGCCAAGCUGCAGCUG UCCAAGGACACCUACGACGACGACCUGGACAACCUGCUGG CCCAGAUCGGCGACCAGUACGCCGACCUGUUCCUGGCCGC CAAGAACCUGUCCGACGCCAUCCUGCUGUCCGACAUCCUG CGGGUGAACACCGAGAUCACCAAGGCCCCCCUGUCCGCCU CCAUGAUCAAGCGGUACGACGAGCACCACCAGGACCUGAC CCUGCUGAAGGCCCUGGUGCGGCAGCAGCUGCCCGAGAAG UACAAGGAGAUCUUCUUCGACCAGUCCAAGAACGGCUACG CCGGCUACAUCGACGGCGGCGCCUCCCAGGAGGAGUUCUA CAAGUUCAUCAAGCCCAUCCUGGAGAAGAUGGACGGCACC GAGGAGCUGCUGGUGAAGCUGAACCGGGAGGACCUGCUG CGGAAGCAGCGGACCUUCGACAACGGCUCCAUCCCCCACC AGAUCCACCUGGGCGAGCUGCACGCCAUCCUGCGGCGGCA GGAGGACUUCUACCCCUUCCUGAAGGACAACCGGGAGAAG AUCGAGAAGAUCCUGACCUUCCGGAUCCCCUACUACGUGG GCCCCCUGGCCCGGGGCAACUCCCGGUUCGCCUGGAUGAC

		CCGGAAGUCCGAGGAGACCAUCACCCCCUGGAACUUCGAG
		GAGGUGGUGGACAAGGGCGCCUCCGCCCAGUCCUUCAUCG
		AGCGGAUGACCAACUUCGACAAGAACCUGCCCAACGAGAA
		GGUGCUGCCCAAGCACUCCCUGCUGUACGAGUACUUCACC
		GUGUACAACGAGCUGACCAAGGUGAAGUACGUGACCGAG
		GGCAUGCGGAAGCCCGCCUUCCUGUCCGGCGAGCAGAAGA
		AGGCCAUCGUGGACCUGCUGUUCAAGACCAACCGGAAGGU
		GACCGUGAAGCAGCUGAAGGAGGACUACUUCAAGAAGAU
		CGAGUGCUUCGACUCCGUGGAGAUCUCCGGCGUGGAGGAC
		CGGUUCAACGCCUCCCCUGGGCACCUACCACGACCUGCUGA
		AGAUCAUCAAGGACAAGGACUUCCUGGACAACGAGGAGA
		ACGAGGACAUCCUGGAGGACAUCGUGCUGACCCUGACCCU
		GUUCGAGGACCGGGAGAUGAUCGAGGAGCGGCUGAAGAC
		CUACGCCCACCUGUUCGACGACAAGGUGAUGAAGCAGCUG
		AAGCGGCGGCGGUACACCGGCUGGGGCCGGCUGUCCCGGA
		AGCUGAUCAACGGCAUCCGGGACAAGCAGUCCGGCAAGAC
		CAUCCUGGACUUCCUGAAGUCCGACGGCUUCGCCAACCGG
		AACUUCAUGCAGCUGAUCCACGACGACUCCCUGACCUUCA
		AGGAGGACAUCCAGAAGGCCCAGGUGUCCGGCCAGGGCGA
		CUCCCUGCACGAGCACAUCGCCAACCUGGCCGGCUCCCCC
		GCCAUCAAGAAGGGCAUCCUGCAGACCGUGAAGGUGGUG
		GACGAGCUGGUGAAGGUGAUGGGCCGGCACAAGCCCGAG
		AACAUCGUGAUCGAGAUGGCCCGGGAGAACCAGACCACCC
		AGAAGGGCCAGAAGAACUCCCGGGAGCGGAUGAAGCGGA
		UCGAGGAGGGCAUCAAGGAGCUGGGCUCCCAGAUCCUGAA
		GGAGCACCCCGUGGAGAACACCCAGCUGCAGAACGAGAAG
		CUGUACCUGUACUACCUGCAGAACGGCCGGGACAUGUACG
		UGGACCAGGAGCUGGACAUCAACCGGCUGUCCGACUACGA
		CGUGGACCACAUCGUGCCCCAGUCCUUCCUGAAGGACGAC
		UCCAUCGACAACAAGGUGCUGACCCGGUCCGACAAGAACC
		GGGGCAAGUCCGACAACGUGCCCUCCGAGGAGGUGGUGAA
		GAAGAUGAAGAACUACUGGCGGCAGCUGCUGAACGCCAA
		GCUGAUCACCCAGCGGAAGUUCGACAACCUGACCAAGGCC
		GAGCGGGGCGGCCUGUCCGAGCUGGACAAGGCCGGCUUCA
		UCAAGCGGCAGCUGGUGGAGACCCGGCAGAUCACCAAGCA

		CGUGGCCCAGAUCCUGGACUCCCGGAUGAACACCAAGUAC GACGAGAACGACAAGCUGAUCCGGGAGGUGAAGGUGAUC ACCCUGAAGUCCAAGCUGGUGUCCGACUUCCGGAAGGACU UCCAGUUCUACAAGGUGCGGGAGAUCAACAACUACCACCA CGCCCACGACGCCUACCUGAACGCCGUGGUGGGCACCGCC CUGAUCAAGAAGUACCCCAAGCUGGAGUCCGAGUUCGUGU ACGGCGACUACAAGGUGUACGACGUGCGGAAGAUGAUCG CCAAGUCCGAGCAGGAGAUCGGCAAGGCCACCGCCAAGUA CUUCUUCUACUCCAACAUCAUGAACUUCUUCAAGACCGAG AUCACCCUGGCCAACGGCGAGAUCCGGAAGCGGCCCCUGA UCGAGACCAACGGCGAGACCGGCGAGAUCGUGUGGGACAA GGGCCGGGACUUCGCCACCGUGCGGAAGGUGCUGUCCAUG CCCCAGGUGAACAUCGUGAAGAAGACCGAGGUGCAGACCG GCGGCUUCUCCAAGGAGUCCAUCCUGCCCAAGCGGAACUC CGACAAGCUGAUCGCCCGGAAGAAGGACUGGGACCCCAAG AAGUACGGCGGCUUCGACUCCCCCACCGUGGCCUACUCCG UGCUGGUGGUGGCCAAGGUGGAGAAGGGCAAGUCCAAGA AGCUGAAGUCCGUGAAGGAGCUGCUGGGCAUCACCAUCAU GGAGCGGUCCUCCUUCGAGAAGAACCCCAUCGACUUCCUG GAGGCCAAGGGCUACAAGGAGGUGAAGAAGGACCUGAUC AUCAAGCUGCCCAAGUACUCCCUGUUCGAGCUGGAGAACG GCCGGAAGCGGAUGCUGGCCUCCGCCGGCGAGCUGCAGAA GGGCAACGAGCUGGCCCUGCCCUCCAAGUACGUGAACUUC CUGUACCUGGCCUCCCACUACGAGAAGCUGAAGGGCUCCC CCGAGGACAACGAGCAGAAGCAGCUGUUCGUGGAGCAGCA CAAGCACUACCUGGACGAGAUCAUCGAGCAGAUCUCCGAG UUCUCCAAGCGGGUGAUCCUGGCCGACGCCAACCUGGACA AGGUGCUGUCCGCCUACAACAAGCACCGGGACAAGCCCAU CCGGGAGCAGGCCGAGAACAUCAUCCACCUGUUCACCCUG ACCAACCUGGGCGCCCCCGCCGCCUUCAAGUACUUCGACA CCACCAUCGACCGGAAGCGGUACACCUCCACCAAGGAGGU GCUGGACGCCACCCUGAUCCACCAGUCCAUCACCGGCCUG UACGAGACCCGGAUCGACCUGUCCCAGCUGGGCGGCGACG GCGGCGGCUCCCCCAAGAAGAAGCGGAAGGUGUGA
Открытая	805	AUGGAGGCCUCCCCCGCCUCCGGCCCCCGGCACCUGAUGG

рамка считывания BC22n с меткой Hibit		ACCCCCACAUCUUCACCUCCAACUUCAACAACGGCAUCGG CCGGCACAAGACCUACCUGUGCUACGAGGUGGAGCGGCUG GACAACGGCACCUCCGUGAAGAUGGACCAGCACCGGGGCU UCCUGCACAACCAGGCCAAGAACCUGCUGUGCGGCUUCUA CGGCCGGCACGCCGAGCUGCGGUUCCUGGACCUGGUGCCC UCCCUGCAGCUGGACCCCGCCCAGAUCUACCGGGUGACCU GGUUCAUCUCCUGGUCCCCCUGCUUCUCCUGGGGCUGCGC CGGCGAGGUGCGGGCCUUCCUGCAGGAGAACACCCACGUG CGGCUGCGGAUCUUCGCCGCCCGGAUCUACGACUACGACC CCCUGUACAAGGAGGCCCUGCAGAUGCUGCGGGACGCCGG CGCCCAGGUGUCCAUCAUGACCUACGACGAGUUCAAGCAC UGCUGGGACACCUUCGUGGACCACCAGGGCUGCCCCUUCC AGCCCUGGGACGGCCUGGACGAGCACUCCCAGGCCCUGUC CGGCCGGCUGCGGGCCAUCCUGCAGAACCAGGGCAACUCC GGCUCCGAGACCCCCGGCACCUCCGAGUCCGCCACCCCCG AGUCCGACAAGAAGUACUCCAUCGGCCUGGCCAUCGGCAC CAACUCCGUGGGCUGGGCCGUGAUCACCGACGAGUACAAG GUGCCCUCCAAGAAGUUCAAGGUGCUGGGCAACACCGACC GGCACUCCAUCAAGAAGAACCUGAUCGGCGCCCUGCUGUU CGACUCCGGCGAGACCGCCGAGGCCACCCGGCUGAAGCGG ACCGCCCGGCGGCGGUACACCCGGCGGAAGAACCGGAUCU GCUACCUGCAGGAGAUCUUCUCCAACGAGAUGGCCAAGGU GGACGACUCCUUCUUCCACCGGCUGGAGGAGUCCUUCCUG GUGGAGGAGGACAAGAAGCACGAGCGGCACCCCAUCUUCG GCAACAUCGUGGACGAGGUGGCCUACCACGAGAAGUACCC CACCAUCUACCACCUGCGGAAGAAGCUGGUGGACUCCACC GACAAGGCCGACCUGCGGCUGAUCUACCUGGCCCUGGCCC ACAUGAUCAAGUUCCGGGGCCACUUCCUGAUCGAGGGCGA CCUGAACCCCGACAACUCCGACGUGGACAAGCUGUUCAUC CAGCUGGUGCAGACCUACAACCAGCUGUUCGAGGAGAACC CCAUCAACGCCUCCGGCGUGGACGCCAAGGCCAUCCUGUC CGCCCGGCUGUCCAAGUCCCGGCGGCUGGAGAACCUGAUC GCCCAGCUGCCCGGCGAGAAGAAGAACGGCCUGUUCGGCA ACCUGAUCGCCCUGUCCCUGGGCCUGACCCCCAACUUCAA GUCCAACUUCGACCUGGCCGAGGACGCCAAGCUGCAGCUG

		UCCAAGGACACCUACGACGACGACCUGGACAACCUGCUGG CCCAGAUCGGCGACCAGUACGCCGACCUGUUCCUGGCCGC CAAGAACCUGUCCGACGCCAUCCUGCUGUCCGACAUCCUG CGGGUGAACACCGAGAUCACCAAGGCCCCCCUGUCCGCCU CCAUGAUCAAGCGGUACGACGAGCACCACCAGGACCUGAC CCUGCUGAAGGCCCUGGUGCGGCAGCAGCUGCCCGAGAAG UACAAGGAGAUCUUCUUCGACCAGUCCAAGAACGGCUACG CCGGCUACAUCGACGGCGGCGCCUCCCAGGAGGAGUUCUA CAAGUUCAUCAAGCCCAUCCUGGAGAAGAUGGACGGCACC GAGGAGCUGCUGGUGAAGCUGAACCGGGAGGACCUGCUG CGGAAGCAGCGGACCUUCGACAACGGCUCCAUCCCCCACC AGAUCCACCUGGGCGAGCUGCACGCCAUCCUGCGGCGGCA GGAGGACUUCUACCCCUUCCUGAAGGACAACCGGGAGAAG AUCGAGAAGAUCCUGACCUUCCGGAUCCCCUACUACGUGG GCCCCCUGGCCCGGGGCAACUCCCGGUUCGCCUGGAUGAC CCGGAAGUCCGAGGAGACCAUCACCCCCUGGAACUUCGAG GAGGUGGUGGACAAGGGCGCCUCCGCCCAGUCCUUCAUCG AGCGGAUGACCAACUUCGACAAGAACCUGCCCAACGAGAA GGUGCUGCCCAAGCACUCCCUGCUGUACGAGUACUUCACC GUGUACAACGAGCUGACCAAGGUGAAGUACGUGACCGAG GGCAUGCGGAAGCCCGCCUUCCUGUCCGGCGAGCAGAAGA AGGCCAUCGUGGACCUGCUGUUCAAGACCAACCGGAAGGU GACCGUGAAGCAGCUGAAGGAGGACUACUUCAAGAAGAU CGAGUGCUUCGACUCCGUGGAGAUCUCCGGCGUGGAGGAC CGGUUCAACGCCUCCCUGGGCACCUACCACGACCUGCUGA AGAUCAUCAAGGACAAGGACUUCCUGGACAACGAGGAGA ACGAGGACAUCCUGGAGGACAUCGUGCUGACCCUGACCCU GUUCGAGGACCGGGAGAUGAUCGAGGAGCGGCUGAAGAC CUACGCCCACCUGUUCGACGACAAGGUGAUGAAGCAGCUG AAGCGGCGGCGGUACACCGGCUGGGGCCGGCUGUCCCGGA AGCUGAUCAACGGCAUCCGGGACAAGCAGUCCGGCAAGAC CAUCCUGGACUUCCUGAAGUCCGACGGCUUCGCCAACCGG AACUUCAUGCAGCUGAUCCACGACGACUCCCUGACCUUCA AGGAGGACAUCCAGAAGGCCCAGGUGUCCGGCCAGGGCGA CUCCCUGCACGAGCACAUCGCCAACCUGGCCGGCUCCCCC

		GCCAUCAAGAAGGGCAUCCUGCAGACCGUGAAGGUGGUG
		GACGAGCUGGUGAAGGUGAUGGGCCGGCACAAGCCCGAG
		AACAUCGUGAUCGAGAUGGCCCGGGAGAACCAGACCACCC
		AGAAGGGCCAGAAGAACUCCCGGGAGCGGAUGAAGCGGA
		UCGAGGAGGGCAUCAAGGAGCUGGGCUCCCAGAUCCUGAA
		GGAGCACCCCGUGGAGAACACCCAGCUGCAGAACGAGAAG
		CUGUACCUGUACUACCUGCAGAACGGCCGGGACAUGUACG
		UGGACCAGGAGCUGGACAUCAACCGGCUGUCCGACUACGA
		CGUGGACCACAUCGUGCCCCAGUCCUUCCUGAAGGACGAC
		UCCAUCGACAACAAGGUGCUGACCCGGUCCGACAAGAACC
		GGGGCAAGUCCGACAACGUGCCCUCCGAGGAGGUGGUGAA
		GAAGAUGAAGAACUACUGGCGGCAGCUGCUGAACGCCAA
		GCUGAUCACCCAGCGGAAGUUCGACAACCUGACCAAGGCC
		GAGCGGGGCGGCCUGUCCGAGCUGGACAAGGCCGGCUUCA
		UCAAGCGGCAGCUGGUGGAGACCCGGCAGAUCACCAAGCA
		CGUGGCCCAGAUCCUGGACUCCCGGAUGAACACCAAGUAC
		GACGAGAACGACAAGCUGAUCCGGGAGGUGAAGGUGAUC
		ACCCUGAAGUCCAAGCUGGUGUCCGACUUCCGGAAGGACU
		UCCAGUUCUACAAGGUGCGGGAGAUCAACAACUACCACCA
		CGCCCACGACGCCUACCUGAACGCCGUGGUGGGCACCGCC
		CUGAUCAAGAAGUACCCCAAGCUGGAGUCCGAGUUCGUGU
		ACGGCGACUACAAGGUGUACGACGUGCGGAAGAUGAUCG
		CCAAGUCCGAGCAGGAGAUCGGCAAGGCCACCGCCAAGUA
		CUUCUUCUACUCCAACAUCAUGAACUUCUUCAAGACCGAG
		AUCACCCUGGCCAACGGCGAGAUCCGGAAGCGGCCCCUGA
		UCGAGACCAACGGCGAGACCGGCGAGAUCGUGUGGGACAA
		GGGCCGGGACUUCGCCACCGUGCGGAAGGUGCUGUCCAUG
		CCCCAGGUGAACAUCGUGAAGAAGACCGAGGUGCAGACCG
		GCGGCUUCUCCAAGGAGUCCAUCCUGCCCAAGCGGAACUC
		CGACAAGCUGAUCGCCCGGAAGAAGGACUGGGACCCCAAG
		AAGUACGGCGGCUUCGACUCCCCCACCGUGGCCUACUCCG
		UGCUGGUGGUGGCCAAGGUGGAGAAGGGCAAGUCCAAGA
		AGCUGAAGUCCGUGAAGGAGCUGCUGGGCAUCACCAUCAU
		GGAGCGGUCCUCCUUCGAGAAGAACCCCAUCGACUUCCUG
		GAGGCCAAGGGCUACAAGGAGGUGAAGAAGGACCUGAUC

		AUCAAGCUGCCCAAGUACUCCCUGUUCGAGCUGGAGAACG GCCGGAAGCGGAUGCUGGCCUCCGCCGGCGAGCUGCAGAA GGGCAACGAGCUGGCCCUGCCCUCCAAGUACGUGAACUUC CUGUACCUGGCCUCCCACUACGAGAAGCUGAAGGGCUCCC CCGAGGACAACGAGCAGAAGCAGCUGUUCGUGGAGCAGCA CAAGCACUACCUGGACGAGAUCAUCGAGCAGAUCUCCGAG UUCUCCAAGCGGGUGAUCCUGGCCGACGCCAACCUGGACA AGGUGCUGUCCGCCUACAACAAGCACCGGGACAAGCCCAU CCGGGAGCAGGCCGAGAACAUCAUCCACCUGUUCACCCUG ACCAACCUGGGCGCCCCCGCCGCCUUCAAGUACUUCGACA CCACCAUCGACCGGAAGCGGUACACCUCCACCAAGGAGGU GCUGGACGCCACCCUGAUCCACCAGUCCAUCACCGGCCUG UACGAGACCCGGAUCGACCUGUCCCAGCUGGGCGGCGACG GCGGCGGCUCCCCCAAGAAGAAGCGGAAGGUGUCCGAGUC CGCCACCCCCGAGUCCGUGUCCGGCUGGCGGCUGUUCAAG AAGAUCUCCUGA
Открытая рамка считывания BC22	806	AUGGAAGCAAGCCCGGCAAGCGGACCGAGACACCUGAUGG ACCCGCACAUCUUCACAAGCAACUUCAACAACGGAAUCGG AAGACACAAGACAUACCUGUGCUACGAAGUCGAAAGACU GGACAACGGAACAAGCGUCAAGAUGGACCAGCACAGAGG AUUCCUGCACAACCAGGCAAAGAACCUGCUGUGCGGAUUC UACGGAAGACACGCAGAACUGAGAUUCCUGGACCUGGUCC CGAGCCUGCAGCUGGACCCGGCACAGAUCUACAGAGUCAC AUGGUUCAUCAGCUGGAGCCCGUGCUUCAGCUGGGGAUGC GCAGGAGAAGUCAGAGCAUUUCUGCAGGAAAACACACAC GUCAGACUGAGAAUCUUCGCAGCAAGAAUCUACGACUACG ACCCGCUGUACAAGGAAGCACUGCAGAUGCUGAGAGACGC AGGAGCACAGGUCAGCAUCAUGACAUACGACGAAUUCAA GCACUGCUGGGACACAUUCGUCGACCACCAGGGAUGCCCG UUCCAGCCGUGGGACGGACUGGACGAACACAGCCAGGCAC UGAGCGGAAGACUGAGAGCAAUCCUGCAGAACCAGGGAA ACAGCGGAAGCGAAACACCGGGAACAAGCGAAAGCGCAAC ACCGGAAAGCGACAAGAAGUACAGCAUCGGACUGGCCAUC GGAACAAACAGCGUCGGAUGGGCAGUCAUCACAGACGAA UACAAGGUCCCGAGCAAGAAGUUCAAGGUCCUGGGAAAC

		ACAGACAGACACAGCAUCAAGAAGAACCUGAUCGGAGCAC
		UGCUGUUCGACAGCGGAGAAACAGCAGAAGCAACAAGAC
		UGAAGAGAACAGCAAGAAGAAGAUACACAAGAAGAAAGA
		ACAGAAUCUGCUACCUGCAGGAAAUCUUCAGCAACGAAAU
		GGCAAAGGUCGACGACAGCUUCUUCCACAGACUGGAAGAA
		AGCUUCCUGGUCGAAGAAGACAAGAAGCACGAAAGACACC
		CGAUCUUCGGAAACAUCGUCGACGAAGUCGCAUACCACGA
		AAAGUACCCGACAAUCUACCACCUGAGAAAGAAGCUGGUC
		GACAGCACAGACAAGGCAGACCUGAGACUGAUCUACCUGG
		CACUGGCACACAUGAUCAAGUUCAGAGGACACUUCCUGAU
		CGAAGGAGACCUGAACCCGGACAACAGCGACGUCGACAAG
		CUGUUCAUCCAGCUGGUCCAGACAUACAACCAGCUGUUCG
		AAGAAAACCCGAUCAACGCAAGCGGAGUCGACGCAAAGGC
		AAUCCUGAGCGCAAGACUGAGCAAGAGCAGAAGACUGGA
		AAACCUGAUCGCACAGCUGCCGGGAGAAAAGAAGAACGG
		ACUGUUCGGAAACCUGAUCGCACUGAGCCUGGGACUGACA
		CCGAACUUCAAGAGCAACUUCGACCUGGCAGAAGACGCAA
		AGCUGCAGCUGAGCAAGGACACAUACGACGACGACCUGGA
		CAACCUGCUGGCACAGAUCGGAGACCAGUACGCAGACCUG
		UUCCUGGCAGCAAAGAACCUGAGCGACGCAAUCCUGCUGA
		GCGACAUCCUGAGAGUCAACACAGAAAUCACAAAGGCACC
		GCUGAGCGCAAGCAUGAUCAAGAGAUACGACGAACACCAC
		CAGGACCUGACACUGCUGAAGGCACUGGUCAGACAGCAGC
		UGCCGGAAAAGUACAAGGAAAUCUUCUUCGACCAGAGCA
		AGAACGGAUACGCAGGAUACAUCGACGGAGGAGCAAGCC
		AGGAAGAAUUCUACAAGUUCAUCAAGCCGAUCCUGGAAA
		AGAUGGACGGAACAGAAGAACUGCUGGUCAAGCUGAACA
		GAGAAGACCUGCUGAGAAAGCAGAGAACAUUCGACAACG
		GAAGCAUCCCGCACCAGAUCCACCUGGGAGAACUGCACGC
		AAUCCUGAGAAGACAGGAAGACUUCUACCCGUUCCUGAAG
		GACAACAGAGAAAAGAUCGAAAAGAUCCUGACAUUCAGA
		AUCCCGUACUACGUCGGACCGCUGGCAAGAGGAAACAGCA
		GAUUCGCAUGGAUGACAAGAAAGAGCGAAGAAACAAUCA
		CACCGUGGAACUUCGAAGAAGUCGUCGACAAGGGAGCAA
		GCGCACAGAGCUUCAUCGAAAGAAUGACAAACUUCGACAA

		GAACCUGCCGAACGAAAAGGUCCUGCCGAAGCACAGCCUG
		CUGUACGAAUACUUCACAGUCUACAACGAACUGACAAAGG
		UCAAGUACGUCACAGAAGGAAUGAGAAAGCCGGCAUUCC
		UGAGCGGAGAACAGAAGAAGGCAAUCGUCGACCUGCUGU
		UCAAGACAAACAGAAAGGUCACAGUCAAGCAGCUGAAGG
		AAGACUACUUCAAGAAGAUCGAAUGCUUCGACAGCGUCG
		AAAUCAGCGGAGUCGAAGACAGAUUCAACGCAAGCCUGG
		GAACAUACCACGACCUGCUGAAGAUCAUCAAGGACAAGGA
		CUUCCUGGACAACGAAGAAAACGAAGACAUCCUGGAAGAC
		AUCGUCCUGACACUGACACUGUUCGAAGACAGAGAAAUG
		AUCGAAGAAAGACUGAAGACAUACGCACACCUGUUCGACG
		ACAAGGUCAUGAAGCAGCUGAAGAGAAGAAGAUACACAG
		GAUGGGGAAGACUGAGCAGAAAGCUGAUCAACGGAAUCA
		GAGACAAGCAGAGCGGAAAGACAAUCCUGGACUUCCUGA
		AGAGCGACGGAUUCGCAAACAGAAACUUCAUGCAGCUGA
		UCCACGACGACAGCCUGACAUUCAAGGAAGACAUCCAGAA
		GGCACAGGUCAGCGGACAGGGAGACAGCCUGCACGAACAC
		AUCGCAAACCUGGCAGGAAGCCCGGCAAUCAAGAAGGGAA
		UCCUGCAGACAGUCAAGGUCGUCGACGAACUGGUCAAGGU
		CAUGGGAAGACACAAGCCGGAAAACAUCGUCAUCGAAAU
		GGCAAGAGAAAACCAGACAACACAGAAGGGACAGAAGAA
		CAGCAGAGAAAGAAUGAAGAGAAUCGAAGAAGGAAUCAA
		GGAACUGGGAAGCCAGAUCCUGAAGGAACACCCGGUCGAA
		AACACACAGCUGCAGAACGAAAAGCUGUACCUGUACUACC
		UGCAGAACGGAAGAGACAUGUACGUCGACCAGGAACUGG
		ACAUCAACAGACUGAGCGACUACGACGUCGACCACAUCGU
		CCCGCAGAGCUUCCUGAAGGACGACAGCAUCGACAACAAG
		GUCCUGACAAGAAGCGACAAGAACAGAGGAAAGAGCGAC
		AACGUCCCGAGCGAAGAAGUCGUCAAGAAGAUGAAGAAC
		UACUGGAGACAGCUGCUGAACGCAAAGCUGAUCACACAGA
		GAAAGUUCGACAACCUGACAAAGGCAGAGAGAGGAGGAC
		UGAGCGAACUGGACAAGGCAGGAUUCAUCAAGAGACAGC
		UGGUCGAAACAAGACAGAUCACAAAGCACGUCGCACAGAU
		CCUGGACAGCAGAAUGAACACAAAGUACGACGAAAACGAC
		AAGCUGAUCAGAGAAGUCAAGGUCAUCACACUGAAGAGC

		AAGCUGGUCAGCGACUUCAGAAAGGACUUCCAGUUCUACA
		AGGUCAGAGAAAUCAACAACUACCACCACGCACACGACGC
		AUACCUGAACGCAGUCGUCGGAACAGCACUGAUCAAGAAG
		UACCCGAAGCUGGAAAGCGAAUUCGUCUACGGAGACUACA
		AGGUCUACGACGUCAGAAAGAUGAUCGCAAAGAGCGAAC
		AGGAAAUCGGAAAGGCAACAGCAAAGUACUUCUUCUACA
		GCAACAUCAUGAACUUCUUCAAGACAGAAAUCACACUGGC
		AAACGGAGAAAUCAGAAAGAGACCGCUGAUCGAAACAAA
		CGGAGAAACAGGAGAAAUCGUCUGGGACAAGGGAAGAGA
		CUUCGCAACAGUCAGAAAGGUCCUGAGCAUGCCGCAGGUC
		AACAUCGUCAAGAAGACAGAAGUCCAGACAGGAGGAUUC
		AGCAAGGAAAGCAUCCUGCCGAAGAGAAACAGCGACAAGC
		UGAUCGCAAGAAAGAAGGACUGGGACCCGAAGAAGUACG
		GAGGAUUCGACAGCCCGACAGUCGCAUACAGCGUCCUGGU
		CGUCGCAAAGGUCGAAAAGGGAAAGAGCAAGAAGCUGAA
		GAGCGUCAAGGAACUGCUGGGAAUCACAAUCAUGGAAAG
		AAGCAGCUUCGAAAAGAACCCGAUCGACUUCCUGGAAGCA
		AAGGGAUACAAGGAAGUCAAGAAGGACCUGAUCAUCAAG
		CUGCCGAAGUACAGCCUGUUCGAACUGGAAAACGGAAGA
		AAGAGAAUGCUGGCAAGCGCAGGAGAACUGCAGAAGGGA
		AACGAACUGGCACUGCCGAGCAAGUACGUCAACUUCCUGU
		ACCUGGCAAGCCACUACGAAAAGCUGAAGGGAAGCCCGGA
		AGACAACGAACAGAAGCAGCUGUUCGUCGAACAGCACAAG
		CACUACCUGGACGAAAUCAUCGAACAGAUCAGCGAAUUCA
		GCAAGAGAGUCAUCCUGGCAGACGCAAACCUGGACAAGGU
		CCUGAGCGCAUACAACAAGCACAGAGACAAGCCGAUCAGA
		GAACAGGCAGAAAACAUCAUCCACCUGUUCACACUGACAA
		ACCUGGGAGCACCGGCAGCAUUCAAGUACUUCGACACAAC
		AAUCGACAGAAAGAGAUACACAAGCACAAAGGAAGUCCU
		GGACGCAACACUGAUCCACCAGAGCAUCACAGGACUGUAC
		GAAACAAGAAUCGAUCUGAGCCAGCUGGGAGGAGACAGC
		GGAGGAAGCACAAACCUGAGCGACAUCAUCGAAAAGGAA
		ACAGGAAAGCAGCUGGUCAUCCAGGAAAGCAUCCUGAUGC
		UGCCGGAAGAAGUCGAAGAAGUCAUCGGAAACAAGCCGG
		AAAGCGACAUCCUGGUCCACACAGCAUACGACGAAAGCAC

		AGACGAAAACGUCAUGCUGCUGACAAGCGACGCACCGGAA UACAAGCCGUGGGCACUGGUCAUCCAGGACAGCAACGGAG AAAACAAGAUCAAGAUGCUGAGCGGAGGAAGCCCGAAGA AGAAGAGAAAGGUCUAA
Открытая рамка считывания UGI	807	AUGGGACCGAAGAAGAAGAGAAAGGUCGGAGGAGGAAGC ACAAACCUGUCGGACAUCAUCGAAAAGGAAACAGGAAAG CAGCUGGUCAUCCAGGAAUCGAUCCUGAUGCUGCCGGAAG AAGUCGAAGAAGUCAUCGGAAACAAGCCGGAAUCGGACA UCCUGGUCCACACAGCAUACGACGAAUCGACAGACGAAAA CGUCAUGCUGCUGACAUCGGACGCACCGGAAUACAAGCCG UGGGCACUGGUCAUCCAGGACUCGAACGGAGAAAACAAG AUCAAGAUGCUGUGA
Открытая рамка считывания UGI	808	AUGACCAACCUGUCCGACAUCAUCGAGAAGGAGACCGGCA AGCAGCUGGUGAUCCAGGAGUCCAUCCUGAUGCUGCCCGA GGAGGUGGAGGAGGUGAUCGGCAACAAGCCCGAGUCCGA CAUCCUGGUGCACACCGCCUACGACGAGUCCACCGACGAG AACGUGAUGCUGCUGACCUCCGACGCCCCCGAGUACAAGC CCUGGGCCCUGGUGAUCCAGGACUCCAACGGCGAGAACAA GAUCAAGAUGCUGUCCGGCGGCUCCAAGCGGACCGCCGAC GGCUCCGAGUUCGAGUCCCCCAAGAAGAAGCGGAAGGUGG AGUGA
Аминокислотная последовательность Cas9, кодируемая SEQ ID No. 801-802	809	MDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSI KKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFS NEMAKVDDSFFHRLEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHE KYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLALAHMIKFRGHFLIEGDL NPDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSK SRRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDA KLQLSKDTYDDDLDNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDI LRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYK EIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVK LNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYPFLKDN REKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEE VVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYFTVYNE LTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLK EDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDN

		EENEDILEDIVLTLTLFEDREMIEERLKTYAHLFDDKVMKQLK RRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANRNFMQ LIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGILQ TVKVVDELVKVMGRHKPENIVIEMARENQTTQKGQKNSRER MKRIEEGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMY VDQELDINRLSDYDVDHIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGK SDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGG LSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLI REVKVITLKSKLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNAV VGTALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMIAKSEQEIGKATA KYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGR DFATVRKVLSMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIA RKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKVEKGKSKKLKSVKE LLGITIMERSSFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELE NGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGSP EDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVILADANLDKVLSA YNKHRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYT STKEVLDATLIHQSITGLYETRIDLSQLGGDGGGSPKKKRKV
Аминокислотная последовательность для Cas9 с меткой HiBit	810	MDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSI KKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFS NEMAKVDDSFFHRLEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHE KYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLALAHMIKFRGHFLIEGDL NPDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSK SRRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDA KLQLSKDTYDDDLDNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDI LRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYK EIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVK LNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYPFLKDN REKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEE VVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYFTVYNE LTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLK EDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDN EENEDILEDIVLTLTLFEDREMIEERLKTYAHLFDDKVMKQLK RRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANRNFMQ LIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGILQ

		TVKVVDELVKVMGRHKPENIVIEMARENQTTQKGQKNSRER MKRIEEGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMY VDQELDINRLSDYDVDHIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGK SDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGG LSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLI REVKVITLKSKLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNAV VGTALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMIAKSEQEIGKATA KYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGR DFATVRKVLSMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIA RKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKVEKGKSKKLKSVKE LLGITIMERSSFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELE NGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGSP EDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVILADANLDKVLSA YNKHRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYT STKEVLDATLIHQSITGLYETRIDLSQLGGDGGGSPKKKRKVSE SATPESVSGWRLFKKIS
Аминокислотная последовательность BC22n	811	MEASPASGPRHLMDPHIFTSNFNNGIGRHKTYLCYEVERLDNG TSVKMDQHRGFLHNQAKNLLCGFYGRHAELRFLDLVPSLQLD PAQIYRVTWFISWSPCFSWGCAGEVRAFLQENTHVRLRIFAARI YDYDPLYKEALQMLRDAGAQVSIMTYDEFKHCWDTFVDHQG CPFQPWDGLDEHSQALSGRLRAILQNQGNSGSETPGTSESATP ESDKKYSIGLAIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHS IKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIF SNEMAKVDDSFFHRLEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYH EKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLALAHMIKFRGHFLIEGD LNPDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLS KSRRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAED AKLQLSKDTYDDDLDNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLS DILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEK YKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELL VKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYPFLK DNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWNF EEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYFTVY NELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQ LKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFL

		DNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIEERLKTYAHLFDDKVMKQ LKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANRNF MQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGI LQTVKVVDELVKVMGRHKPENIVIEMARENQTTQKGQKNSRE RMKRIEEGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDM YVDQELDINRLSDYDVDHIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRG KSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERG GLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKL IREVKVITLKSKLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNAV VGTALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMIAKSEQEIGKATA KYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGR DFATVRKVLSMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIA RKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKVEKGKSKKLKSVKE LLGITIMERSSFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELE NGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGSP EDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVILADANLDKVLSA YNKHRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYT STKEVLDATLIHQSITGLYETRIDLSQLGGDGGGSPKKKRKV*
Аминокислотная последовательность для BC22n с меткой Hibit	812	MEASPASGPRHLMDPHIFTSNFNNGIGRHKTYLCYEVERLDNG TSVKMDQHRGFLHNQAKNLLCGFYGRHAELRFLDLVPSLQLD PAQIYRVTWFISWSPCFSWGCAGEVRAFLQENTHVRLRIFAARI YDYDPLYKEALQMLRDAGAQVSIMTYDEFKHCWDTFVDHQG CPFQPWDGLDEHSQALSGRLRAILQNQGNSGSETPGTSESATP ESDKKYSIGLAIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHS IKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIF SNEMAKVDDSFFHRLEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYH EKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLALAHMIKFRGHFLIEGD LNPDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLS KSRRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAED AKLQLSKDTYDDDLDNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLS DILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEK YKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELL VKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYPFLK DNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWNF EEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYFTVY

		NELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQ LKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFL DNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIEERLKTYAHLFDDKVMKQ LKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANRNF MQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGI LQTVKVVDELVKVMGRHKPENIVIEMARENQTTQKGQKNSRE RMKRIEEGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDM YVDQELDINRLSDYDVDHIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRG KSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERG GLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKL IREVKVITLKSKLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNAV VGTALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMIAKSEQEIGKATA KYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGR DFATVRKVLSMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIA RKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKVEKGKSKKLKSVKE LLGITIMERSSFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELE NGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGSP EDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVILADANLDKVLSA YNKHRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYT STKEVLDATLIHQSITGLYETRIDLSQLGGDGGGSPKKKRKVSE SATPESVSGWRLFKKIS
Аминокислотная последовательность BC22	813	MEASPASGPRHLMDPHIFTSNFNNGIGRHKTYLCYEVERLDNG TSVKMDQHRGFLHNQAKNLLCGFYGRHAELRFLDLVPSLQLD PAQIYRVTWFISWSPCFSWGCAGEVRAFLQENTHVRLRIFAARI YDYDPLYKEALQMLRDAGAQVSIMTYDEFKHCWDTFVDHQG CPFQPWDGLDEHSQALSGRLRAILQNQGNSGSETPGTSESATP ESDKKYSIGLAIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHS IKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIF SNEMAKVDDSFFHRLEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYH EKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLALAHMIKFRGHFLIEGD LNPDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLS KSRRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAED AKLQLSKDTYDDDLDNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLS DILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEK YKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELL

		VKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYPFLK DNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWNF EEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYFTVY NELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQ LKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFL DNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIEERLKTYAHLFDDKVMKQ LKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANRNF MQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGI LQTVKVVDELVKVMGRHKPENIVIEMARENQTTQKGQKNSRE RMKRIEEGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDM YVDQELDINRLSDYDVDHIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRG KSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERG GLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKL IREVKVITLKSKLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNAV VGTALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMIAKSEQEIGKATA KYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGR DFATVRKVLSMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIA RKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKVEKGKSKKLKSVKE LLGITIMERSSFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELE NGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGSP EDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVILADANLDKVLSA YNKHRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYT STKEVLDATLIHQSITGLYETRIDLSQLGGDSGGSTNLSDIIEKE TGKQLVIQESILMLPEEVEEVIGNKPESDILVHTAYDESTDENV MLLTSDAPEYKPWALVIQDSNGENKIKMLSGGSPKKKRKV
Аминокислотная последовательность UGI	814	MTNLSDIIEKETGKQLVIQESILMLPEEVEEVIGNKPESDILVHT AYDESTDENVMLLTSDAPEYKPWALVIQDSNGENKIKMLSGG SKRTADGSEFESPKKKRKVE
Последовательность мРНК, кодирующая UGI	815	GGGAAGCUCAGAAUAAACGCUCAACUUUGGCCGGAUCUGC CACCAUGACCAACCUGUCCGACAUCAUCGAGAAGGAGACC GGCAAGCAGCUGGUGAUCCAGGAGUCCAUCCUGAUGCUGC CCGAGGAGGUGGAGGAGGUGAUCGGCAACAAGCCCGAGU CCGACAUCCUGGUGCACACCGCCUACGACGAGUCCACCGA CGAGAACGUGAUGCUGCUGACCUCCGACGCCCCCGAGUAC

		AAGCCCUGGGCCCUGGUGAUCCAGGACUCCAACGGCGAGA ACAAGAUCAAGAUGCUGUCCGGCGGCUCCAAGCGGACCGC CGACGGCUCCGAGUUCGAGUCCCCCAAGAAGAAGCGGAAG GUGGAGUGAUAGCUAGCACCAGCCUCAAGAACACCCGAAU GGAGUCUCUAAGCUACAUAAUACCAACUUACACUUUACAA AAUGUUGUCCCCCAAAAUGUAGCCAUUCGUAUCUGCUCCU AAUAAAAAGAAAGUUUCUUCACAUUCUCUCGAGAAAAAA AAAAAAUGGAAAAAAAAAAAACGGAAAAAAAAAAAAGGU AAAAAAAAAAAAUAUAAAAAAAAAAAAACAUAAAAAAAAA AAACGAAAAAAAAAAAACGUAAAAAAAAAAAAACUCAAAA AAAAAAAAGAUAAAAAAAAAAAACCUAAAAAAAAAAAAU GUAAAAAAAAAAAAGGGAAAAAAAAAAAACGCAAAAAAA AAAAACACAAAAAAAAAAAAUGCAAAAAAAAAAAAUCGA AAAAAAAAAAAUCUAAAAAAAAAAAAACGAAAAAAAAAA ACCCAAAAAAAAAAAAAGACAAAAAAAAAAAAUAGAAAAA AAAAAAAGUUAAAAAAAAAAAACUGAAAAAAAAAAAAUU UAAAAAAAAAAAAUCUAG
	816-899	Не используется
Линкер	900	SGSETPGTSESATPES
Линкер	901	SGSETPGTSESA
Линкер	902	SGSETPGTSESATPEGGSGGS
	903-971	Не используется
мРНК, кодирующая BC22n	972	GGGAAGCUCAGAAUAAACGCUCAACUUUGGCCGGAUCUGC CACCAUGGAGGCCUCCCCCGCCUCCGGCCCCCGGCACCUG AUGGACCCCCACAUCUUCACCUCCAACUUCAACAACGGCA UCGGCCGGCACAAGACCUACCUGUGCUACGAGGUGGAGCG GCUGGACAACGGCACCUCCGUGAAGAUGGACCAGCACCGG GGCUUCCUGCACAACCAGGCCAAGAACCUGCUGUGCGGCU UCUACGGCCGGCACGCCGAGCUGCGGUUCCUGGACCUGGU GCCCUCCCUGCAGCUGGACCCCGCCCAGAUCUACCGGGUG ACCUGGUUCAUCUCCUGGUCCCCCUGCUUCUCCUGGGGCU GCGCCGGCGAGGUGCGGGCCUUCCUGCAGGAGAACACCCA CGUGCGGCUGCGGAUCUUCGCCGCCCGGAUCUACGACUAC

		GACCCCCUGUACAAGGAGGCCCUGCAGAUGCUGCGGGACG CCGGCGCCCAGGUGUCCAUCAUGACCUACGACGAGUUCAA GCACUGCUGGGACACCUUCGUGGACCACCAGGGCUGCCCC UUCCAGCCCUGGGACGGCCUGGACGAGCACUCCCAGGCCC UGUCCGGCCGGCUGCGGGCCAUCCUGCAGAACCAGGGCAA CUCCGGCUCCGAGACCCCCGGCACCUCCGAGUCCGCCACCC CCGAGUCCGACAAGAAGUACUCCAUCGGCCUGGCCAUCGG CACCAACUCCGUGGGCUGGGCCGUGAUCACCGACGAGUAC AAGGUGCCCUCCAAGAAGUUCAAGGUGCUGGGCAACACCG ACCGGCACUCCAUCAAGAAGAACCUGAUCGGCGCCCUGCU GUUCGACUCCGGCGAGACCGCCGAGGCCACCCGGCUGAAG CGGACCGCCCGGCGGCGGUACACCCGGCGGAAGAACCGGA UCUGCUACCUGCAGGAGAUCUUCUCCAACGAGAUGGCCAA GGUGGACGACUCCUUCUUCCACCGGCUGGAGGAGUCCUUC CUGGUGGAGGAGGACAAGAAGCACGAGCGGCACCCCAUCU UCGGCAACAUCGUGGACGAGGUGGCCUACCACGAGAAGUA CCCCACCAUCUACCACCUGCGGAAGAAGCUGGUGGACUCC ACCGACAAGGCCGACCUGCGGCUGAUCUACCUGGCCCUGG CCCACAUGAUCAAGUUCCGGGGCCACUUCCUGAUCGAGGG CGACCUGAACCCCGACAACUCCGACGUGGACAAGCUGUUC AUCCAGCUGGUGCAGACCUACAACCAGCUGUUCGAGGAGA ACCCCAUCAACGCCUCCGGCGUGGACGCCAAGGCCAUCCU GUCCGCCCGGCUGUCCAAGUCCCGGCGGCUGGAGAACCUG AUCGCCCAGCUGCCCGGCGAGAAGAAGAACGGCCUGUUCG GCAACCUGAUCGCCCUGUCCCUGGGCCUGACCCCCAACUU CAAGUCCAACUUCGACCUGGCCGAGGACGCCAAGCUGCAG CUGUCCAAGGACACCUACGACGACGACCUGGACAACCUGC UGGCCCAGAUCGGCGACCAGUACGCCGACCUGUUCCUGGC CGCCAAGAACCUGUCCGACGCCAUCCUGCUGUCCGACAUC CUGCGGGUGAACACCGAGAUCACCAAGGCCCCCCUGUCCG CCUCCAUGAUCAAGCGGUACGACGAGCACCACCAGGACCU GACCCUGCUGAAGGCCCUGGUGCGGCAGCAGCUGCCCGAG AAGUACAAGGAGAUCUUCUUCGACCAGUCCAAGAACGGCU ACGCCGGCUACAUCGACGGCGGCGCCUCCCAGGAGGAGUU CUACAAGUUCAUCAAGCCCAUCCUGGAGAAGAUGGACGGC

		ACCGAGGAGCUGCUGGUGAAGCUGAACCGGGAGGACCUGC
		UGCGGAAGCAGCGGACCUUCGACAACGGCUCCAUCCCCCA
		CCAGAUCCACCUGGGCGAGCUGCACGCCAUCCUGCGGCGG
		CAGGAGGACUUCUACCCCUUCCUGAAGGACAACCGGGAGA
		AGAUCGAGAAGAUCCUGACCUUCCGGAUCCCCUACUACGU
		GGGCCCCCUGGCCCGGGGCAACUCCCGGUUCGCCUGGAUG
		ACCCGGAAGUCCGAGGAGACCAUCACCCCCUGGAACUUCG
		AGGAGGUGGUGGACAAGGGCGCCUCCGCCCAGUCCUUCAU
		CGAGCGGAUGACCAACUUCGACAAGAACCUGCCCAACGAG
		AAGGUGCUGCCCAAGCACUCCCUGCUGUACGAGUACUUCA
		CCGUGUACAACGAGCUGACCAAGGUGAAGUACGUGACCGA
		GGGCAUGCGGAAGCCCGCCUUCCUGUCCGGCGAGCAGAAG
		AAGGCCAUCGUGGACCUGCUGUUCAAGACCAACCGGAAGG
		UGACCGUGAAGCAGCUGAAGGAGGACUACUUCAAGAAGA
		UCGAGUGCUUCGACUCCGUGGAGAUCUCCGGCGUGGAGGA
		CCGGUUCAACGCCUCCCUGGGCACCUACCACGACCUGCUG
		AAGAUCAUCAAGGACAAGGACUUCCUGGACAACGAGGAG
		AACGAGGACAUCCUGGAGGACAUCGUGCUGACCCUGACCC
		UGUUCGAGGACCGGGAGAUGAUCGAGGAGCGGCUGAAGA
		CCUACGCCCACCUGUUCGACGACAAGGUGAUGAAGCAGCU
		GAAGCGGCGGCGGUACACCGGCUGGGGCCGGCUGUCCCGG
		AAGCUGAUCAACGGCAUCCGGGACAAGCAGUCCGGCAAGA
		CCAUCCUGGACUUCCUGAAGUCCGACGGCUUCGCCAACCG
		GAACUUCAUGCAGCUGAUCCACGACGACUCCCUGACCUUC
		AAGGAGGACAUCCAGAAGGCCCAGGUGUCCGGCCAGGGCG
		ACUCCCUGCACGAGCACAUCGCCAACCUGGCCGGCUCCCC
		CGCCAUCAAGAAGGGCAUCCUGCAGACCGUGAAGGUGGUG
		GACGAGCUGGUGAAGGUGAUGGGCCGGCACAAGCCCGAG
		AACAUCGUGAUCGAGAUGGCCCGGGAGAACCAGACCACCC
		AGAAGGGCCAGAAGAACUCCCGGGAGCGGAUGAAGCGGA
		UCGAGGAGGGCAUCAAGGAGCUGGGCUCCCAGAUCCUGAA
		GGAGCACCCCGUGGAGAACACCCAGCUGCAGAACGAGAAG
		CUGUACCUGUACUACCUGCAGAACGGCCGGGACAUGUACG
		UGGACCAGGAGCUGGACAUCAACCGGCUGUCCGACUACGA
		CGUGGACCACAUCGUGCCCCAGUCCUUCCUGAAGGACGAC

		UCCAUCGACAACAAGGUGCUGACCCGGUCCGACAAGAACC GGGGCAAGUCCGACAACGUGCCCUCCGAGGAGGUGGUGAA GAAGAUGAAGAACUACUGGCGGCAGCUGCUGAACGCCAA GCUGAUCACCCAGCGGAAGUUCGACAACCUGACCAAGGCC GAGCGGGGCGGCCUGUCCGAGCUGGACAAGGCCGGCUUCA UCAAGCGGCAGCUGGUGGAGACCCGGCAGAUCACCAAGCA CGUGGCCCAGAUCCUGGACUCCCGGAUGAACACCAAGUAC GACGAGAACGACAAGCUGAUCCGGGAGGUGAAGGUGAUC ACCCUGAAGUCCAAGCUGGUGUCCGACUUCCGGAAGGACU UCCAGUUCUACAAGGUGCGGGAGAUCAACAACUACCACCA CGCCCACGACGCCUACCUGAACGCCGUGGUGGGCACCGCC CUGAUCAAGAAGUACCCCAAGCUGGAGUCCGAGUUCGUGU ACGGCGACUACAAGGUGUACGACGUGCGGAAGAUGAUCG CCAAGUCCGAGCAGGAGAUCGGCAAGGCCACCGCCAAGUA CUUCUUCUACUCCAACAUCAUGAACUUCUUCAAGACCGAG AUCACCCUGGCCAACGGCGAGAUCCGGAAGCGGCCCCUGA UCGAGACCAACGGCGAGACCGGCGAGAUCGUGUGGGACAA GGGCCGGGACUUCGCCACCGUGCGGAAGGUGCUGUCCAUG CCCCAGGUGAACAUCGUGAAGAAGACCGAGGUGCAGACCG GCGGCUUCUCCAAGGAGUCCAUCCUGCCCAAGCGGAACUC CGACAAGCUGAUCGCCCGGAAGAAGGACUGGGACCCCAAG AAGUACGGCGGCUUCGACUCCCCCACCGUGGCCUACUCCG UGCUGGUGGUGGCCAAGGUGGAGAAGGGCAAGUCCAAGA AGCUGAAGUCCGUGAAGGAGCUGCUGGGCAUCACCAUCAU GGAGCGGUCCUCCUUCGAGAAGAACCCCAUCGACUUCCUG GAGGCCAAGGGCUACAAGGAGGUGAAGAAGGACCUGAUC AUCAAGCUGCCCAAGUACUCCCUGUUCGAGCUGGAGAACG GCCGGAAGCGGAUGCUGGCCUCCGCCGGCGAGCUGCAGAA GGGCAACGAGCUGGCCCUGCCCUCCAAGUACGUGAACUUC CUGUACCUGGCCUCCCACUACGAGAAGCUGAAGGGCUCCC CCGAGGACAACGAGCAGAAGCAGCUGUUCGUGGAGCAGCA CAAGCACUACCUGGACGAGAUCAUCGAGCAGAUCUCCGAG UUCUCCAAGCGGGUGAUCCUGGCCGACGCCAACCUGGACA AGGUGCUGUCCGCCUACAACAAGCACCGGGACAAGCCCAU CCGGGAGCAGGCCGAGAACAUCAUCCACCUGUUCACCCUG

		ACCAACCUGGGCGCCCCCGCCGCCUUCAAGUACUUCGACA CCACCAUCGACCGGAAGCGGUACACCUCCACCAAGGAGGU GCUGGACGCCACCCUGAUCCACCAGUCCAUCACCGGCCUG UACGAGACCCGGAUCGACCUGUCCCAGCUGGGCGGCGACG GCGGCGGCUCCCCCAAGAAGAAGCGGAAGGUGUGACUAGC ACCAGCCUCAAGAACACCCGAAUGGAGUCUCUAAGCUACA UAAUACCAACUUACACUUUACAAAAUGUUGUCCCCCAAAA UGUAGCCAUUCGUAUCUGCUCCUAAUAAAAAGAAAGUUU CUUCACAUUCUCUCGAGAAAAAAAAAAAAUGGAAAAAAA AAAAACGGAAAAAAAAAAAAGGUAAAAAAAAAAAAUAUA AAAAAAAAAAACAUAAAAAAAAAAAAACGAAAAAAAAAAA ACGUAAAAAAAAAAAAACUCAAAAAAAAAAAAGAUAAAAA AAAAAAACCUAAAAAAAAAAAAUGUAAAAAAAAAAAAGG GAAAAAAAAAAAACGCAAAAAAAAAAAACACAAAAAAAA AAAAUGCAAAAAAAAAAAAUCGAAAAAAAAAAAAUCUAA AAAAAAAAAACGAAAAAAAAAAAACCCAAAAAAAAAAAA GACAAAAAAAAAAAAUAGAAAAAAAAAAAAGUUAAAAAA AAAAAACUGAAAAAAAAAAAAUUUAAAAAAAAAAAAUCU AG
мРНК, кодирующая BC22n с меткой HiBit	973	GGGAAGCUCAGAAUAAACGCUCAACUUUGGCCGGAUCUGC CACCAUGGAGGCCUCCCCCGCCUCCGGCCCCCGGCACCUG AUGGACCCCCACAUCUUCACCUCCAACUUCAACAACGGCA UCGGCCGGCACAAGACCUACCUGUGCUACGAGGUGGAGCG GCUGGACAACGGCACCUCCGUGAAGAUGGACCAGCACCGG GGCUUCCUGCACAACCAGGCCAAGAACCUGCUGUGCGGCU UCUACGGCCGGCACGCCGAGCUGCGGUUCCUGGACCUGGU GCCCUCCCUGCAGCUGGACCCCGCCCAGAUCUACCGGGUG ACCUGGUUCAUCUCCUGGUCCCCCUGCUUCUCCUGGGGCU GCGCCGGCGAGGUGCGGGCCUUCCUGCAGGAGAACACCCA CGUGCGGCUGCGGAUCUUCGCCGCCCGGAUCUACGACUAC GACCCCCUGUACAAGGAGGCCCUGCAGAUGCUGCGGGACG CCGGCGCCCAGGUGUCCAUCAUGACCUACGACGAGUUCAA GCACUGCUGGGACACCUUCGUGGACCACCAGGGCUGCCCC UUCCAGCCCUGGGACGGCCUGGACGAGCACUCCCAGGCCC UGUCCGGCCGGCUGCGGGCCAUCCUGCAGAACCAGGGCAA

		CUCCGGCUCCGAGACCCCCGGCACCUCCGAGUCCGCCACCC
		CCGAGUCCGACAAGAAGUACUCCAUCGGCCUGGCCAUCGG
		CACCAACUCCGUGGGCUGGGCCGUGAUCACCGACGAGUAC
		AAGGUGCCCUCCAAGAAGUUCAAGGUGCUGGGCAACACCG
		ACCGGCACUCCAUCAAGAAGAACCUGAUCGGCGCCCUGCU
		GUUCGACUCCGGCGAGACCGCCGAGGCCACCCGGCUGAAG
		CGGACCGCCCGGCGGCGGUACACCCGGCGGAAGAACCGGA
		UCUGCUACCUGCAGGAGAUCUUCUCCAACGAGAUGGCCAA
		GGUGGACGACUCCUUCUUCCACCGGCUGGAGGAGUCCUUC
		CUGGUGGAGGAGGACAAGAAGCACGAGCGGCACCCCAUCU
		UCGGCAACAUCGUGGACGAGGUGGCCUACCACGAGAAGUA
		CCCCACCAUCUACCACCUGCGGAAGAAGCUGGUGGACUCC
		ACCGACAAGGCCGACCUGCGGCUGAUCUACCUGGCCCUGG
		CCCACAUGAUCAAGUUCCGGGGCCACUUCCUGAUCGAGGG
		CGACCUGAACCCCGACAACUCCGACGUGGACAAGCUGUUC
		AUCCAGCUGGUGCAGACCUACAACCAGCUGUUCGAGGAGA
		ACCCCAUCAACGCCUCCGGCGUGGACGCCAAGGCCAUCCU
		GUCCGCCCGGCUGUCCAAGUCCCGGCGGCUGGAGAACCUG
		AUCGCCCAGCUGCCCGGCGAGAAGAAGAACGGCCUGUUCG
		GCAACCUGAUCGCCCUGUCCCUGGGCCUGACCCCCAACUU
		CAAGUCCAACUUCGACCUGGCCGAGGACGCCAAGCUGCAG
		CUGUCCAAGGACACCUACGACGACGACCUGGACAACCUGC
		UGGCCCAGAUCGGCGACCAGUACGCCGACCUGUUCCUGGC
		CGCCAAGAACCUGUCCGACGCCAUCCUGCUGUCCGACAUC
		CUGCGGGUGAACACCGAGAUCACCAAGGCCCCCCUGUCCG
		CCUCCAUGAUCAAGCGGUACGACGAGCACCACCAGGACCU
		GACCCUGCUGAAGGCCCUGGUGCGGCAGCAGCUGCCCGAG
		AAGUACAAGGAGAUCUUCUUCGACCAGUCCAAGAACGGCU
		ACGCCGGCUACAUCGACGGCGGCGCCUCCCAGGAGGAGUU
		CUACAAGUUCAUCAAGCCCAUCCUGGAGAAGAUGGACGGC
		ACCGAGGAGCUGCUGGUGAAGCUGAACCGGGAGGACCUGC
		UGCGGAAGCAGCGGACCUUCGACAACGGCUCCAUCCCCCA
		CCAGAUCCACCUGGGCGAGCUGCACGCCAUCCUGCGGCGG
		CAGGAGGACUUCUACCCCUUCCUGAAGGACAACCGGGAGA
		AGAUCGAGAAGAUCCUGACCUUCCGGAUCCCCUACUACGU

		GGGCCCCCUGGCCCGGGGCAACUCCCGGUUCGCCUGGAUG ACCCGGAAGUCCGAGGAGACCAUCACCCCCUGGAACUUCG AGGAGGUGGUGGACAAGGGCGCCUCCGCCCAGUCCUUCAU CGAGCGGAUGACCAACUUCGACAAGAACCUGCCCAACGAG AAGGUGCUGCCCAAGCACUCCCUGCUGUACGAGUACUUCA CCGUGUACAACGAGCUGACCAAGGUGAAGUACGUGACCGA GGGCAUGCGGAAGCCCGCCUUCCUGUCCGGCGAGCAGAAG AAGGCCAUCGUGGACCUGCUGUUCAAGACCAACCGGAAGG UGACCGUGAAGCAGCUGAAGGAGGACUACUUCAAGAAGA UCGAGUGCUUCGACUCCGUGGAGAUCUCCGGCGUGGAGGA CCGGUUCAACGCCUCCCUGGGCACCUACCACGACCUGCUG AAGAUCAUCAAGGACAAGGACUUCCUGGACAACGAGGAG AACGAGGACAUCCUGGAGGACAUCGUGCUGACCCUGACCC UGUUCGAGGACCGGGAGAUGAUCGAGGAGCGGCUGAAGA CCUACGCCCACCUGUUCGACGACAAGGUGAUGAAGCAGCU GAAGCGGCGGCGGUACACCGGCUGGGGCCGGCUGUCCCGG AAGCUGAUCAACGGCAUCCGGGACAAGCAGUCCGGCAAGA CCAUCCUGGACUUCCUGAAGUCCGACGGCUUCGCCAACCG GAACUUCAUGCAGCUGAUCCACGACGACUCCCUGACCUUC AAGGAGGACAUCCAGAAGGCCCAGGUGUCCGGCCAGGGCG ACUCCCUGCACGAGCACAUCGCCAACCUGGCCGGCUCCCC CGCCAUCAAGAAGGGCAUCCUGCAGACCGUGAAGGUGGUG GACGAGCUGGUGAAGGUGAUGGGCCGGCACAAGCCCGAG AACAUCGUGAUCGAGAUGGCCCGGGAGAACCAGACCACCC AGAAGGGCCAGAAGAACUCCCGGGAGCGGAUGAAGCGGA UCGAGGAGGGCAUCAAGGAGCUGGGCUCCCAGAUCCUGAA GGAGCACCCCGUGGAGAACACCCAGCUGCAGAACGAGAAG CUGUACCUGUACUACCUGCAGAACGGCCGGGACAUGUACG UGGACCAGGAGCUGGACAUCAACCGGCUGUCCGACUACGA CGUGGACCACAUCGUGCCCCAGUCCUUCCUGAAGGACGAC UCCAUCGACAACAAGGUGCUGACCCGGUCCGACAAGAACC GGGGCAAGUCCGACAACGUGCCCUCCGAGGAGGUGGUGAA GAAGAUGAAGAACUACUGGCGGCAGCUGCUGAACGCCAA GCUGAUCACCCAGCGGAAGUUCGACAACCUGACCAAGGCC GAGCGGGGCGGCCUGUCCGAGCUGGACAAGGCCGGCUUCA

		UCAAGCGGCAGCUGGUGGAGACCCGGCAGAUCACCAAGCA CGUGGCCCAGAUCCUGGACUCCCGGAUGAACACCAAGUAC GACGAGAACGACAAGCUGAUCCGGGAGGUGAAGGUGAUC ACCCUGAAGUCCAAGCUGGUGUCCGACUUCCGGAAGGACU UCCAGUUCUACAAGGUGCGGGAGAUCAACAACUACCACCA CGCCCACGACGCCUACCUGAACGCCGUGGUGGGCACCGCC CUGAUCAAGAAGUACCCCAAGCUGGAGUCCGAGUUCGUGU ACGGCGACUACAAGGUGUACGACGUGCGGAAGAUGAUCG CCAAGUCCGAGCAGGAGAUCGGCAAGGCCACCGCCAAGUA CUUCUUCUACUCCAACAUCAUGAACUUCUUCAAGACCGAG AUCACCCUGGCCAACGGCGAGAUCCGGAAGCGGCCCCUGA UCGAGACCAACGGCGAGACCGGCGAGAUCGUGUGGGACAA GGGCCGGGACUUCGCCACCGUGCGGAAGGUGCUGUCCAUG CCCCAGGUGAACAUCGUGAAGAAGACCGAGGUGCAGACCG GCGGCUUCUCCAAGGAGUCCAUCCUGCCCAAGCGGAACUC CGACAAGCUGAUCGCCCGGAAGAAGGACUGGGACCCCAAG AAGUACGGCGGCUUCGACUCCCCCACCGUGGCCUACUCCG UGCUGGUGGUGGCCAAGGUGGAGAAGGGCAAGUCCAAGA AGCUGAAGUCCGUGAAGGAGCUGCUGGGCAUCACCAUCAU GGAGCGGUCCUCCUUCGAGAAGAACCCCAUCGACUUCCUG GAGGCCAAGGGCUACAAGGAGGUGAAGAAGGACCUGAUC AUCAAGCUGCCCAAGUACUCCCUGUUCGAGCUGGAGAACG GCCGGAAGCGGAUGCUGGCCUCCGCCGGCGAGCUGCAGAA GGGCAACGAGCUGGCCCUGCCCUCCAAGUACGUGAACUUC CUGUACCUGGCCUCCCACUACGAGAAGCUGAAGGGCUCCC CCGAGGACAACGAGCAGAAGCAGCUGUUCGUGGAGCAGCA CAAGCACUACCUGGACGAGAUCAUCGAGCAGAUCUCCGAG UUCUCCAAGCGGGUGAUCCUGGCCGACGCCAACCUGGACA AGGUGCUGUCCGCCUACAACAAGCACCGGGACAAGCCCAU CCGGGAGCAGGCCGAGAACAUCAUCCACCUGUUCACCCUG ACCAACCUGGGCGCCCCCGCCGCCUUCAAGUACUUCGACA CCACCAUCGACCGGAAGCGGUACACCUCCACCAAGGAGGU GCUGGACGCCACCCUGAUCCACCAGUCCAUCACCGGCCUG UACGAGACCCGGAUCGACCUGUCCCAGCUGGGCGGCGACG GCGGCGGCUCCCCCAAGAAGAAGCGGAAGGUGUCCGAGUC

		CGCCACCCCCGAGUCCGUGUCCGGCUGGCGGCUGUUCAAG AAGAUCUCCUGACUAGCACCAGCCUCAAGAACACCCGAAU GGAGUCUCUAAGCUACAUAAUACCAACUUACACUUUACAA AAUGUUGUCCCCCAAAAUGUAGCCAUUCGUAUCUGCUCCU AAUAAAAAGAAAGUUUCUUCACAUUCUCUCGAGAAAAAA AAAAAAUGGAAAAAAAAAAAACGGAAAAAAAAAAAAGGU AAAAAAAAAAAAUAUAAAAAAAAAAAAACAUAAAAAAAAA AAACGAAAAAAAAAAAACGUAAAAAAAAAAAAACUCAAAA AAAAAAAAGAUAAAAAAAAAAAACCUAAAAAAAAAAAAU GUAAAAAAAAAAAAGGGAAAAAAAAAAAACGCAAAAAAA AAAAACACAAAAAAAAAAAAUGCAAAAAAAAAAAAUCGA AAAAAAAAAAAUCUAAAAAAAAAAAAACGAAAAAAAAAA ACCCAAAAAAAAAAAAAGACAAAAAAAAAAAAUAGAAAAA AAAAAAAGUUAAAAAAAAAAAACUGAAAAAAAAAAAAUU UAAAAAAAAAAAAUCUAG
мРНК, кодирующая BC22	974	GGGAGACCCAAGCUGGCUAGCGUUUAAACUUAAGCUUUCC CGCAGUCGGCGUCCAGCGGCUCUGCUUGUUCGUGUGUGUG UCGUUGCAGGCCUUAUUCGGAUCCGCCACCAUGGAAGCAA GCCCGGCAAGCGGACCGAGACACCUGAUGGACCCGCACAU CUUCACAAGCAACUUCAACAACGGAAUCGGAAGACACAAG ACAUACCUGUGCUACGAAGUCGAAAGACUGGACAACGGA ACAAGCGUCAAGAUGGACCAGCACAGAGGAUUCCUGCACA ACCAGGCAAAGAACCUGCUGUGCGGAUUCUACGGAAGACA CGCAGAACUGAGAUUCCUGGACCUGGUCCCGAGCCUGCAG CUGGACCCGGCACAGAUCUACAGAGUCACAUGGUUCAUCA GCUGGAGCCCGUGCUUCAGCUGGGGAUGCGCAGGAGAAG UCAGAGCAUUUCUGCAGGAAAACACACACGUCAGACUGAG AAUCUUCGCAGCAAGAAUCUACGACUACGACCCGCUGUAC AAGGAAGCACUGCAGAUGCUGAGAGACGCAGGAGCACAG GUCAGCAUCAUGACAUACGACGAAUUCAAGCACUGCUGGG ACACAUUCGUCGACCACCAGGGAUGCCCGUUCCAGCCGUG GGACGGACUGGACGAACACAGCCAGGCACUGAGCGGAAGA CUGAGAGCAAUCCUGCAGAACCAGGGAAACAGCGGAAGCG AAACACCGGGAACAAGCGAAAGCGCAACACCGGAAAGCGA CAAGAAGUACAGCAUCGGACUGGCCAUCGGAACAAACAGC

		GUCGGAUGGGCAGUCAUCACAGACGAAUACAAGGUCCCGA
		GCAAGAAGUUCAAGGUCCUGGGAAACACAGACAGACACA
		GCAUCAAGAAGAACCUGAUCGGAGCACUGCUGUUCGACAG
		CGGAGAAACAGCAGAAGCAACAAGACUGAAGAGAACAGC
		AAGAAGAAGAUACACAAGAAGAAAGAACAGAAUCUGCUA
		CCUGCAGGAAAUCUUCAGCAACGAAAUGGCAAAGGUCGAC
		GACAGCUUCUUCCACAGACUGGAAGAAAGCUUCCUGGUCG
		AAGAAGACAAGAAGCACGAAAGACACCCGAUCUUCGGAA
		ACAUCGUCGACGAAGUCGCAUACCACGAAAAGUACCCGAC
		AAUCUACCACCUGAGAAAGAAGCUGGUCGACAGCACAGAC
		AAGGCAGACCUGAGACUGAUCUACCUGGCACUGGCACACA
		UGAUCAAGUUCAGAGGACACUUCCUGAUCGAAGGAGACC
		UGAACCCGGACAACAGCGACGUCGACAAGCUGUUCAUCCA
		GCUGGUCCAGACAUACAACCAGCUGUUCGAAGAAAACCCG
		AUCAACGCAAGCGGAGUCGACGCAAAGGCAAUCCUGAGCG
		CAAGACUGAGCAAGAGCAGAAGACUGGAAAACCUGAUCG
		CACAGCUGCCGGGAGAAAAGAAGAACGGACUGUUCGGAA
		ACCUGAUCGCACUGAGCCUGGGACUGACACCGAACUUCAA
		GAGCAACUUCGACCUGGCAGAAGACGCAAAGCUGCAGCUG
		AGCAAGGACACAUACGACGACGACCUGGACAACCUGCUGG
		CACAGAUCGGAGACCAGUACGCAGACCUGUUCCUGGCAGC
		AAAGAACCUGAGCGACGCAAUCCUGCUGAGCGACAUCCUG
		AGAGUCAACACAGAAAUCACAAAGGCACCGCUGAGCGCAA
		GCAUGAUCAAGAGAUACGACGAACACCACCAGGACCUGAC
		ACUGCUGAAGGCACUGGUCAGACAGCAGCUGCCGGAAAAG
		UACAAGGAAAUCUUCUUCGACCAGAGCAAGAACGGAUAC
		GCAGGAUACAUCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAAUUC
		UACAAGUUCAUCAAGCCGAUCCUGGAAAAGAUGGACGGA
		ACAGAAGAACUGCUGGUCAAGCUGAACAGAGAAGACCUG
		CUGAGAAAGCAGAGAACAUUCGACAACGGAAGCAUCCCGC
		ACCAGAUCCACCUGGGAGAACUGCACGCAAUCCUGAGAAG
		ACAGGAAGACUUCUACCCGUUCCUGAAGGACAACAGAGAA
		AAGAUCGAAAAGAUCCUGACAUUCAGAAUCCCGUACUACG
		UCGGACCGCUGGCAAGAGGAAACAGCAGAUUCGCAUGGA
		UGACAAGAAAGAGCGAAGAAACAAUCACACCGUGGAACU

		UCGAAGAAGUCGUCGACAAGGGAGCAAGCGCACAGAGCU
		UCAUCGAAAGAAUGACAAACUUCGACAAGAACCUGCCGAA
		CGAAAAGGUCCUGCCGAAGCACAGCCUGCUGUACGAAUAC
		UUCACAGUCUACAACGAACUGACAAAGGUCAAGUACGUCA
		CAGAAGGAAUGAGAAAGCCGGCAUUCCUGAGCGGAGAAC
		AGAAGAAGGCAAUCGUCGACCUGCUGUUCAAGACAAACA
		GAAAGGUCACAGUCAAGCAGCUGAAGGAAGACUACUUCA
		AGAAGAUCGAAUGCUUCGACAGCGUCGAAAUCAGCGGAG
		UCGAAGACAGAUUCAACGCAAGCCUGGGAACAUACCACGA
		CCUGCUGAAGAUCAUCAAGGACAAGGACUUCCUGGACAAC
		GAAGAAAACGAAGACAUCCUGGAAGACAUCGUCCUGACAC
		UGACACUGUUCGAAGACAGAGAAAUGAUCGAAGAAAGAC
		UGAAGACAUACGCACACCUGUUCGACGACAAGGUCAUGAA
		GCAGCUGAAGAGAAGAAGAUACACAGGAUGGGGAAGACU
		GAGCAGAAAGCUGAUCAACGGAAUCAGAGACAAGCAGAG
		CGGAAAGACAAUCCUGGACUUCCUGAAGAGCGACGGAUUC
		GCAAACAGAAACUUCAUGCAGCUGAUCCACGACGACAGCC
		UGACAUUCAAGGAAGACAUCCAGAAGGCACAGGUCAGCG
		GACAGGGAGACAGCCUGCACGAACACAUCGCAAACCUGGC
		AGGAAGCCCGGCAAUCAAGAAGGGAAUCCUGCAGACAGUC
		AAGGUCGUCGACGAACUGGUCAAGGUCAUGGGAAGACAC
		AAGCCGGAAAACAUCGUCAUCGAAAUGGCAAGAGAAAAC
		CAGACAACACAGAAGGGACAGAAGAACAGCAGAGAAAGA
		AUGAAGAGAAUCGAAGAAGGAAUCAAGGAACUGGGAAGC
		CAGAUCCUGAAGGAACACCCGGUCGAAAACACACAGCUGC
		AGAACGAAAAGCUGUACCUGUACUACCUGCAGAACGGAA
		GAGACAUGUACGUCGACCAGGAACUGGACAUCAACAGACU
		GAGCGACUACGACGUCGACCACAUCGUCCCGCAGAGCUUC
		CUGAAGGACGACAGCAUCGACAACAAGGUCCUGACAAGAA
		GCGACAAGAACAGAGGAAAGAGCGACAACGUCCCGAGCGA
		AGAAGUCGUCAAGAAGAUGAAGAACUACUGGAGACAGCU
		GCUGAACGCAAAGCUGAUCACACAGAGAAAGUUCGACAAC
		CUGACAAAGGCAGAGAGAGGAGGACUGAGCGAACUGGAC
		AAGGCAGGAUUCAUCAAGAGACAGCUGGUCGAAACAAGA
		CAGAUCACAAAGCACGUCGCACAGAUCCUGGACAGCAGAA

		UGAACACAAAGUACGACGAAAACGACAAGCUGAUCAGAG
		AAGUCAAGGUCAUCACACUGAAGAGCAAGCUGGUCAGCG
		ACUUCAGAAAGGACUUCCAGUUCUACAAGGUCAGAGAAA
		UCAACAACUACCACCACGCACACGACGCAUACCUGAACGC
		AGUCGUCGGAACAGCACUGAUCAAGAAGUACCCGAAGCUG
		GAAAGCGAAUUCGUCUACGGAGACUACAAGGUCUACGAC
		GUCAGAAAGAUGAUCGCAAAGAGCGAACAGGAAAUCGGA
		AAGGCAACAGCAAAGUACUUCUUCUACAGCAACAUCAUGA
		ACUUCUUCAAGACAGAAAUCACACUGGCAAACGGAGAAA
		UCAGAAAGAGACCGCUGAUCGAAACAAACGGAGAAACAG
		GAGAAAUCGUCUGGGACAAGGGAAGAGACUUCGCAACAG
		UCAGAAAGGUCCUGAGCAUGCCGCAGGUCAACAUCGUCAA
		GAAGACAGAAGUCCAGACAGGAGGAUUCAGCAAGGAAAG
		CAUCCUGCCGAAGAGAAACAGCGACAAGCUGAUCGCAAGA
		AAGAAGGACUGGGACCCGAAGAAGUACGGAGGAUUCGAC
		AGCCCGACAGUCGCAUACAGCGUCCUGGUCGUCGCAAAGG
		UCGAAAAGGGAAAGAGCAAGAAGCUGAAGAGCGUCAAGG
		AACUGCUGGGAAUCACAAUCAUGGAAAGAAGCAGCUUCG
		AAAAGAACCCGAUCGACUUCCUGGAAGCAAAGGGAUACA
		AGGAAGUCAAGAAGGACCUGAUCAUCAAGCUGCCGAAGU
		ACAGCCUGUUCGAACUGGAAAACGGAAGAAAGAGAAUGC
		UGGCAAGCGCAGGAGAACUGCAGAAGGGAAACGAACUGG
		CACUGCCGAGCAAGUACGUCAACUUCCUGUACCUGGCAAG
		CCACUACGAAAAGCUGAAGGGAAGCCCGGAAGACAACGAA
		CAGAAGCAGCUGUUCGUCGAACAGCACAAGCACUACCUGG
		ACGAAAUCAUCGAACAGAUCAGCGAAUUCAGCAAGAGAG
		UCAUCCUGGCAGACGCAAACCUGGACAAGGUCCUGAGCGC
		AUACAACAAGCACAGAGACAAGCCGAUCAGAGAACAGGCA
		GAAAACAUCAUCCACCUGUUCACACUGACAAACCUGGGAG
		CACCGGCAGCAUUCAAGUACUUCGACACAACAAUCGACAG
		AAAGAGAUACACAAGCACAAAGGAAGUCCUGGACGCAAC
		ACUGAUCCACCAGAGCAUCACAGGACUGUACGAAACAAGA
		AUCGAUCUGAGCCAGCUGGGAGGAGACAGCGGAGGAAGC
		ACAAACCUGAGCGACAUCAUCGAAAAGGAAACAGGAAAG
		CAGCUGGUCAUCCAGGAAAGCAUCCUGAUGCUGCCGGAAG

		AAGUCGAAGAAGUCAUCGGAAACAAGCCGGAAAGCGACA UCCUGGUCCACACAGCAUACGACGAAAGCACAGACGAAAA CGUCAUGCUGCUGACAAGCGACGCACCGGAAUACAAGCCG UGGGCACUGGUCAUCCAGGACAGCAACGGAGAAAACAAG AUCAAGAUGCUGAGCGGAGGAAGCCCGAAGAAGAAGAGA AAGGUCUAAUAGUCUAGACAUCACAUUUAAAAGCAUCUC AGCCUACCAUGAGAAUAAGAGAAAGAAAAUGAAGAUCAA UAGCUUAUUCAUCUCUUUUUCUUUUUCGUUGGUGUAAAG CCAACACCCUGUCUAAAAAACAUAAAUUUCUUUAAUCAUU UUGCCUCUUUUCUCUGUGCUUCAAUUAAUAAAAAAUGGA AAGAACCUCGAGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AAAGCGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAACCG AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA U
мРНК, кодирующая UGI	975	GGGAGACCCAAGCUGGCUAGCUCCCGCAGUCGGCGUCCAG CGGCUCUGCUUGUUCGUGUGUGUGUCGUUGCAGGCCUUA UUCGGAUCCGCCACCAUGGGACCGAAGAAGAAGAGAAAG GUCGGAGGAGGAAGCACAAACCUGUCGGACAUCAUCGAA AAGGAAACAGGAAAGCAGCUGGUCAUCCAGGAAUCGAUC CUGAUGCUGCCGGAAGAAGUCGAAGAAGUCAUCGGAAAC AAGCCGGAAUCGGACAUCCUGGUCCACACAGCAUACGACG AAUCGACAGACGAAAACGUCAUGCUGCUGACAUCGGACGC ACCGGAAUACAAGCCGUGGGCACUGGUCAUCCAGGACUCG AACGGAGAAAACAAGAUCAAGAUGCUGUGAUAGUCUAGA CAUCACAUUUAAAAGCAUCUCAGCCUACCAUGAGAAUAAG AGAAAGAAAAUGAAGAUCAAUAGCUUAUUCAUCUCUUUU UCUUUUUCGUUGGUGUAAAGCCAACACCCUGUCUAAAAA ACAUAAAUUUCUUUAAUCAUUUUGCCUCUUUUCUCUGUG CUUCAAUUAAUAAAAAAUGGAAAGAACCUCGAGUCUAG
	976-999	Не используется
Вставка TCR HD1, включая ITR	1000	ttggccactccctctctgcgcgctcgctcgctcactgaggccgggcgaccaaaggtcgcccgacg cccgggctttgcccgggcggcctcagtgagcgagcgagcgcgcagagagggagtggccaactc catcactaggggttcctagatcttgccaacataccataaacctcccattctgctaatgcccagcctaa gttggggagaccactccagattccaagatgtacagtttgctttgctgggccttttttcccatgcctgcctt

		tactctgccagagttatattgctggggttttgaagaagatcctattaaataaaagaataagcagtattatt aagtagccctgcatttcaggtttccttgagtggcaggccaggcctggccgtgaacgttcactgaaat catggcctcttggccaagattgatagcttgtgcctgtccctgagtcccagtccatcacgagcagctg gtttctaagatgctatttcccgtataaagcatgagaccgtgacttgccagccccacagagccccgcc cttgtccatcactggcatctggactccagcctgggttggggcaaagagggaaatgagatcatgtcct aaccctgatcctcttgtcccacagatatccagaaccctgaccctgcggctccggtgcccgtcagtgg gcagagcgcacatcgcccacagtccccgagaagttgggggggaggggtcggcaattgaaccggt gcctagagaaggtggcgcggggtaaactgggaaagtgatgtcgtgtactggctccgccttttcccc gagggtgggggagaaccgtatataagtgcagtagtcgccgtgaacgttctttttcgcaacgggtttg ccgccagaacacaggtaagtgccgtgtgtggttcccgcgggcctggcctctttacgggttatggcc cttgcgtgccttgaattacttccacgcccctggctgcagtacgtgattcttgatcccgagcttcgggtt ggaagtgggtgggagagttcgaggccttgcgcttaaggagccccttcgcctcgtgcttgagttgag gcctggcttgggcgctggggccgccgcgtgcgaatctggtggcaccttcgcgcctgtctcgctgct ttcgataagtctctagccatttaaaatttttgatgacctgctgcgacgctttttttctggcaagatagtctt gtaaatgcgggccaagatgtgcacactggtatttcggttttggggccgcgggcggcgacggggc ccgtgcgtcccagcgcacatgttcggcgaggcggggcctgcgagcgcggccaccgagaatcgg acgggggtagtctcaagctggccggcctgctctggtgcctggcctcgcgccgccgtgtatcgccc cgccctgggcggcaaggctggcccggtcggcaccagttgcgtgagcggaaagatggccgcttcc cggccctgctgcagggagctcaaaatggaggacgcggcgctcgggagagcgggcgggtgagt cacccacacaaaggaaaagggcctttccgtcctcagccgtcgcttcatgtgactccacggagtacc gggcgccgtccaggcacctcgattagttctcgagcttttggagtacgtcgtctttaggttgggggga ggggttttatgcgatggagtttccccacactgagtgggtggagactgaagttaggccagcttggcac ttgatgtaattctccttggaatttgccctttttgagtttggatcttggttcattctcaagcctcagacagtgg ttcaaagttttttttcttccatttcaggtgtcgtgatgcggccgccaccatgggatcttggacactgtgttg cgtgtccctgtgcatcctggtggccaagcacacagatgccggcgtgatccagtctcctagacacga agtgaccgagatgggccaagaagtgaccctgcgctgcaagcctatcagcggccacgattacctgt tctggtacagacagaccatgatgagaggcctggaactgctgatctacttcaacaacaacgtgcccat cgacgacagcggcatgcccgaggatagattcagcgccaagatgcccaacgccagcttcagcacc ctgaagatccagcctagcgagcccagagatagcgccgtgtacttctgcgccagcagaaagacag gcggctacagcaatcagccccagcactttggagatggcacccggctgagcatcctggaagatctg aagaacgtgttcccacctgaggtggccgtgttcgagccttctgaggccgagatcagccacacaca gaaagccacactcgtgtgtctggccaccggcttctatcccgatcacgtggaactgtcttggtgggtc aacggcaaagaggtgcacagcggcgtcagcaccgatcctcagcctctgaaagagcagcccgctc tgaacgacagcagatactgcctgagcagcagactgagagtgtccgccaccttctggcagaacccc agaaaccacttcagatgccaggtgcagttctacggcctgagcgagaacgatgagtggacccagga

		tagagccaagcctgtgacacagatcgtgtctgccgaagcctggggcagagccgattgtggctttac cagcgagagctaccagcagggcgtgctgtctgccacaatcctgtacgagatcctgctgggcaaag ccactctgtacgccgtgctggtgtctgccctggtgctgatggccatggtcaagcggaaggatagca ggggcggctccggtgccacaaacttctccctgctcaagcaggccggagatgtggaagagaaccc tggccctatggaaaccctgctgaaggtgctgagcggcacactgctgtggcagctgacatgggtcc gatctcagcagcctgtgcagtctcctcaggccgtgattctgagagaaggcgaggacgccgtgatca actgcagcagctctaaggccctgtacagcgtgcactggtacagacagaagcacggcgaggcccc tgtgttcctgatgatcctgctgaaaggcggcgagcagaagggccacgagaagatcagcgccagct tcaacgagaagaagcagcagtccagcctgtacctgacagccagccagctgagctacagcggcac ctacttttgtggcaccgcctggatcaacgactacaagctgtctttcggagccggcaccacagtgaca gtgcgggccaatattcagaaccccgatcctgccgtgtaccagctgagagacagcaagagcagcg acaagagcgtgtgcctgttcaccgacttcgacagccagaccaacgtgtcccagagcaaggacagc gacgtgtacatcaccgataagactgtgctggacatgcggagcatggacttcaagagcaacagcgc cgtggcctggtccaacaagagcgatttcgcctgcgccaacgccttcaacaacagcattatccccga ggacacattcttcccaagtcctgagagcagctgcgacgtgaagctggtggaaaagagcttcgaga cagacaccaacctgaacttccagaacctgagcgtgatcggcttcagaatcctgctgctcaaggtgg ccggcttcaacctgctgatgaccctgagactgtggtccagctaacctCGACTGTGCCTTC TAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCCTCCCCCGTGCCTTC CTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCACTGTCCTTTCCTAATA AAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATT CTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGA GGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTG GGCTCTATGGcttctgaggcggaaagaaccagctggggctctaggggtatccccacta gtcgtgtaccagctgagagactctaaatccagtgacaagtctgtctgcctattcaccgattttgattctc aaacaaatgtgtcacaaagtaaggattctgatgtgtatatcacagacaaaactgtgctagacatgag gtctatggacttcaagagcaacagtgctgtggcctggagcaacaaatctgactttgcatgtgcaaac gccttcaacaacagcattattccagaagacaccttcttccccagcccaggtaagggcagctttggtg ccttcgcaggctgtttccttgcttcaggaatggccaggttctgcccagagctctggtcaatgatgtcta aaactcctctgattggtggtctcggccttatccattgccaccaaaaccctcttttttactaagaaacagtg agccttgttctggcagtccagagaatgacacgggaaaaaagcagatgaagagaaggtggcagga gagggcacgtggcccagcctcagtctctagatctaggaacccctagtgatggagttggccactccc tctctgcgcgctcgctcgctcactgaggccgcccgggcaaagcccgggcgtcgggcgacctttgg tcgcccggcctcagtgagcgagcgagcgcgcagagagggagtggccaa
pAAV_CIITA-EF1a-	1001	TTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCC GGGCGACCAAAGGTCGCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGC

mCherry-G13674		GGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCC AACTCCATCACTAGGGGTTCCT
pAAV_CIITA-EF1a-mCherry-G13675	1002	TTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCC GGGCGACCAAAGGTCGCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGC GGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCC AACTCCATCACTAGGGGTTCCTAGATCTCTGAGAGCTGGCA CACTGCCCGGCACAAAGTAGGGCTGTGGCTGTGACTGAGAA GAAGTGGCCGGTCCCGGAGGAGCGTCAGGGCTCTGTCTTGG TGCTCTGTCATCCCTGAGCTCTCAAAGTAGCGCATCACGTAT GCCTGGGCCTGCTCCATGGAGAAGCCGGACAGCTCAAATAG GGCGTCGGCCTTGCTCAGGCTCTGGACCAGGCGGCCCCGGG GCCGGGCTGTGAGGAGGAGGGTGCAACCTCGGAGCAGCTT CTTCTGGAAAAGGCCGGCCAGCAGCCCCCGGAGGGAGCAG GGCTCCGCCGGTGCCGGTCCGCACGTGCTGTGCAGGAAGCC ATCTTGCGCTTCCAGCTCCTCGAAGCCGTCTAGGATGAGCA GAACGCGGTCAGGTCTCTTCAAGATGTGGCTGAAAACCTCA TCGGCCGCCACGAGTGGCTGTGGGCCCAGGGAGAAGAGCA GATCCTGCAGGCCATAGGCATCCCCCGGACGGTTCAAGGGG GATACCCCCTAGAGCCCCAGCTGGTTCTTTCCGCCTCAGAA GCCATAGAGCCCACCGCATCCCCAGCATGCCTGCTATTGTC TTCCCAATCCTCCCCCTTGCTGTCCTGCCCCACCCCACCCCC CAGAATAGAATGACACCTACTCAGACAATGCGATGCAATTT CCTCATTTTATTAGGAAAGGACAGTGGGAGTGGCACCTTCC AGGGTCAAGGAAGGCACGGGGGAGGGGCAAACAACAGATG GCTGGCAACTAGAAGGCACAGTCGAGGACTAGTCTACTTGT ACAGCTCGTCCATGCCGCCGGTGGAGTGGCGGCCCTCGGCG CGTTCGTACTGTTCCACGATGGTGTAGTCCTCGTTGTGGGAG GTGATGTCCAACTTGATGTTGACGTTGTAGGCGCCGGGCAG CTGCACGGGCTTCTTGGCCTTGTAGGTGGTCTTGACCTCAGC GTCGTAGTGGCCGCCGTCCTTCAGCTTCAGCCTCTGCTTGAT CTCGCCCTTCAGGGCGCCGTCCTCGGGGTACATCCGCTCGG AGGAGGCCTCCCAGCCCATGGTCTTCTTCTGCATTACGGGG CCGTCGGAGGGGAAGTTGGTGCCGCGCAGCTTCACCTTGTA GATGAACTCGCCGTCCTGGAGGGAGGAGTCCTGGGTCACGG TCACCACGCCGCCGTCCTCGAAGTTCATCACGCGCTCCCACT

		TGAAGCCCTCGGGGAAGGACAGCTTCAAGTAGTCGGGGAT GTCGGCGGGGTGCTTCACGTAGGCCTTGGAGCCGTACATGA ACTGAGGGGACAGGATGTCCCAGGCGAAGGGCAGGGGGCC ACCCTTGGTCACCTTCAGCTTGGCGGTCTGGGTGCCCTCGTA GGGGCGGCCCTCGCCCTCGCCCTCGATCTCGAACTCGTGGC CGTTCACGGAGCCCTCCATGTGCACCTTGAAGCGCATGAAC TCCTTGATGATGGCCATGTTATCCTCCTCGCCCTTGCTCACC ATGGTGGCGGCCGCATCACGACACCTGAAATGGAAGAAAA AAACTTTGAACCACTGTCTGAGGCTTGAGAATGAACCAAGA TCCAAACTCAAAAAGGGCAAATTCCAAGGAGAATTACATCA AGTGCCAAGCTGGCCTAACTTCAGTCTCCACCCACTCAGTG TGGGGAAACTCCATCGCATAAAACCCCTCCCCCCAACCTAA AGACGACGTACTCCAAAAGCTCGAGAACTAATCGAGGTGCC TGGACGGCGCCCGGTACTCCGTGGAGTCACATGAAGCGACG GCTGAGGACGGAAAGGCCCTTTTCCTTTGTGTGGGTGACTC ACCCGCCCGCTCTCCCGAGCGCCGCGTCCTCCATTTTGAGCT CCCTGCAGCAGGGCCGGGAAGCGGCCATCTTTCCGCTCACG CAACTGGTGCCGACCGGGCCAGCCTTGCCGCCCAGGGCGGG GCGATACACGGCGGCGCGAGGCCAGGCACCAGAGCAGGCC GGCCAGCTTGAGACTACCCCCGTCCGATTCTCGGTGGCCGC GCTCGCAGGCCCCGCCTCGCCGAACATGTGCGCTGGGACGC ACGGGCCCCGTCGCCGCCCGCGGCCCCAAAAACCGAAATAC CAGTGTGCACATCTTGGCCCGCATTTACAAGACTATCTTGCC AGAAAAAAAGCGTCGCAGCAGGTCATCAAAAATTTTAAAT GGCTAGAGACTTATCGAAAGCAGCGAGACAGGCGCGAAGG TGCCACCAGATTCGCACGCGGCGGCCCCAGCGCCCAAGCCA GGCCTCAACTCAAGCACGAGGCGAAGGGGCTCCTTAAGCGC AAGGCCTCGAACTCTCCCACCCACTTCCAACCCGAAGCTCG GGATCAAGAATCACGTACTGCAGCCAGGGGCGTGGAAGTA ATTCAAGGCACGCAAGGGCCATAACCCGTAAAGAGGCCAG GCCCGCGGGAACCACACACGGCACTTACCTGTGTTCTGGCG GCAAACCCGTTGCGAAAAAGAACGTTCACGGCGACTACTGC ACTTATATACGGTTCTCCCCCACCCTCGGGAAAAAGGCGGA GCCAGTACACGACATCACTTTCCCAGTTTACCCCGCGCCAC CTTCTCTAGGCACCGGTTCAATTGCCGACCCCTCCCCCCAAC

		TTCTCGGGGACTGTGGGCGATGTGCGCTCTGCCCACTGACG GGCACCGGAGCCCAATGGCAGGGGACAGAGAAGACAAAGT CGTACTGGGGAAGCCGGCCACAAGCCCAGGCCCGGCTCACT GCCCCAGCCCAATAGCTCTTGCCCTGACCAGCTTTGCCCAG CACAGCAATCACTCGTGTCTCACGCGGCCGCCGGTGCTCCT TGGCAGCCAACAGCACCTCAGCCAGGCCTCCTTGGGCCAGC TGCCGTTCTGCCCAGTCCGGGGTGGCCAGTTCCCGCTCCAG GCTCTTGCTGCTGCTCCTCTCCAGCCTGGCCTGCACCAGATC CACCTCCACTAGGATGCCATCCGGGCCTGCGGGCTCGGCAC CATACGTGTCCTGCAGTGAGCGGTAGAACTGCTCCACCGGC TCTGCAAAGGCCAGGGGCGTGTCAGGGTGGGGGTATGTGA GAGGCAGGGCCAGGGCCAGCCACCACAAGGCCAGCACTGC CACCATCATTTACATCTGTTCCCCACACAGTTTTTTTGTTTGT TTGTTTTGTTTTGTTTTGAGAGATCTAGGAACCCCTAGTGAT GGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGA GGCCGCCCGGGCAAAGCCCGGGCGTCGGGCGACCTTTGGTC GCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGT GGCCAA
pAAV_CIITA-EF1a-mCherry-G13676	1003	TTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCC GGGCGACCAAAGGTCGCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGC GGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCC AACTCCATCACTAGGGGTTCCTAGATCTGCATGAGCCCAGG AGGTTGAGGTTGCAGCGAGCTGTGATCACACCACTGCATTC CAGCCTGGGCAAAAAAGCCAGACCCTGTCTCAAAACAAAA CAAAACAAACAAACAAAAAAACTGTGTGGGGAACAGATGT AAATGATGGTGGCAGTGCTGGCCTTGTGGTGGCTGGCCCTG GCCCTGCCTCTCACATACCCCCACCCTGACACGCCCCTGGCC TTTGCAGAGCCGGTGGAGCAGTTCTACCGCTCACTGCAGGA CACGTATGGTGCCGAGCCCGCAGGCCCGGATGGCATCCTAG TGGAGGTGGATCTGGTGCAGGCCAGGCTGGAGAGGAGCAG CAGCAAGAGCCTGGAGCGGGAACTGGCCACCCCGGACTGG GCAGAACGGCAGCTGGCCCAAGGAGGCCTGGCTGAGGTGC TGTTGGCTGCCAAGGAGCACCGGCGGCCGCGTGAGACACG AGTGATTGCTGTGCTGGGCAAAGCTGGTCAGGGCAAGAGCT GGCTCCGGTGCCCGTCAGTGGGCAGAGCGCACATCGCCCAC

		AGTCCCCGAGAAGTTGGGGGGAGGGGTCGGCAATTGAACC GGTGCCTAGAGAAGGTGGCGCGGGGTAAACTGGGAAAGTG ATGTCGTGTACTGGCTCCGCCTTTTTCCCGAGGGTGGGGGA GAACCGTATATAAGTGCAGTAGTCGCCGTGAACGTTCTTTTT CGCAACGGGTTTGCCGCCAGAACACAGGTAAGTGCCGTGTG TGGTTCCCGCGGGCCTGGCCTCTTTACGGGTTATGGCCCTTG CGTGCCTTGAATTACTTCCACGCCCCTGGCTGCAGTACGTGA TTCTTGATCCCGAGCTTCGGGTTGGAAGTGGGTGGGAGAGT TCGAGGCCTTGCGCTTAAGGAGCCCCTTCGCCTCGTGCTTGA GTTGAGGCCTGGCTTGGGCGCTGGGGCCGCCGCGTGCGAAT CTGGTGGCACCTTCGCGCCTGTCTCGCTGCTTTCGATAAGTC TCTAGCCATTTAAAATTTTTGATGACCTGCTGCGACGCTTTT TTTCTGGCAAGATAGTCTTGTAAATGCGGGCCAAGATGTGC ACACTGGTATTTCGGTTTTTGGGGCCGCGGGCGGCGACGGG GCCCGTGCGTCCCAGCGCACATGTTCGGCGAGGCGGGGCCT GCGAGCGCGGCCACCGAGAATCGGACGGGGGTAGTCTCAA GCTGGCCGGCCTGCTCTGGTGCCTGGCCTCGCGCCGCCGTG TATCGCCCCGCCCTGGGCGGCAAGGCTGGCCCGGTCGGCAC CAGTTGCGTGAGCGGAAAGATGGCCGCTTCCCGGCCCTGCT GCAGGGAGCTCAAAATGGAGGACGCGGCGCTCGGGAGAGC GGGCGGGTGAGTCACCCACACAAAGGAAAAGGGCCTTTCC GTCCTCAGCCGTCGCTTCATGTGACTCCACGGAGTACCGGG CGCCGTCCAGGCACCTCGATTAGTTCTCGAGCTTTTGGAGTA CGTCGTCTTTAGGTTGGGGGGAGGGGTTTTATGCGATGGAG TTTCCCCACACTGAGTGGGTGGAGACTGAAGTTAGGCCAGC TTGGCACTTGATGTAATTCTCCTTGGAATTTGCCCTTTTTGA GTTTGGATCTTGGTTCATTCTCAAGCCTCAGACAGTGGTTCA AAGTTTTTTTCTTCCATTTCAGGTGTCGTGATGCGGCCGCCA CCATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGGATAACATGGCCATCAT CAAGGAGTTCATGCGCTTCAAGGTGCACATGGAGGGCTCCG TGAACGGCCACGAGTTCGAGATCGAGGGCGAGGGCGAGGG CCGCCCCTACGAGGGCACCCAGACCGCCAAGCTGAAGGTG ACCAAGGGTGGCCCCCTGCCCTTCGCCTGGGACATCCTGTC CCCTCAGTTCATGTACGGCTCCAAGGCCTACGTGAAGCACC CCGCCGACATCCCCGACTACTTGAAGCTGTCCTTCCCCGAG

		GGCTTCAAGTGGGAGCGCGTGATGAACTTCGAGGACGGCG GCGTGGTGACCGTGACCCAGGACTCCTCCCTCCAGGACGGC GAGTTCATCTACAAGGTGAAGCTGCGCGGCACCAACTTCCC CTCCGACGGCCCCGTAATGCAGAAGAAGACCATGGGCTGG GAGGCCTCCTCCGAGCGGATGTACCCCGAGGACGGCGCCCT GAAGGGCGAGATCAAGCAGAGGCTGAAGCTGAAGGACGGC GGCCACTACGACGCTGAGGTCAAGACCACCTACAAGGCCA AGAAGCCCGTGCAGCTGCCCGGCGCCTACAACGTCAACATC AAGTTGGACATCACCTCCCACAACGAGGACTACACCATCGT GGAACAGTACGAACGCGCCGAGGGCCGCCACTCCACCGGC GGCATGGACGAGCTGTACAAGTAGACTAGTCCTCGACTGTG CCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCCTCCCCCGTG CCTTCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCACTGTCCTTTCC TAATAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTG TCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGG GGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGC GGTGGGCTCTATGGCTTCTGAGGCGGAAAGAACCAGCTGGG GCTCTAGGGGGTATCCCCATTGGGCTGGGGCAGTGAGCCGG GCCTGGGCTTGTGGCCGGCTTCCCCAGTACGACTTTGTCTTC TCTGTCCCCTGCCATTGCTTGAACCGTCCGGGGGATGCCTAT GGCCTGCAGGATCTGCTCTTCTCCCTGGGCCCACAGCCACTC GTGGCGGCCGATGAGGTTTTCAGCCACATCTTGAAGAGACC TGACCGCGTTCTGCTCATCCTAGACGGCTTCGAGGAGCTGG AAGCGCAAGATGGCTTCCTGCACAGCACGTGCGGACCGGCA CCGGCGGAGCCCTGCTCCCTCCGGGGGCTGCTGGCCGGCCT TTTCCAGAAGAAGCTGCTCCGAGGTTGCACCCTCCTCCTCAC AGCCCGGCCCCGGGGCCGCCTGGTCCAGAGCCTGAGCAAG GCCGACGCCCTATTTGAGCTGTCCGGCTTCTCCATGGAGCA GGCCCAGGCATACGTGATGCGCTACTTTGAGAGCTCAGGGA TGACAGAGCACCAAGACAGAGCCAGATCTAGGAACCCCTA GTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTC ACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCGGGCGTCGGGCGACCTT TGGTCGCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAG GGAGTGGCCAA
Лентивирус	1004	gcgatcgcagtaatcaattacggggtcattagttcatagcccatatatggagttccgcgttacataact

ный геном, кодирующий HLA-E, экспрессируется промотором EF1a		tacggtaaatggcccgcctggctgaccgcccaacgacccccgcccattgacgtcaataatgacgta tgttcccatagtaacgccaatagggactttccattgacgtcaatgggtggagtatttacggtaaactgc ccacttggcagtacatcaagtgtatcatatgccaagtacgccccctattgacgtcaatgacggtaaat ggcccgcctggcattatgcccagtacatgaccttatgggactttcctacttggcagtacatctacgtat tagtcatcgctattaccatgGTGATGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGG CGTGGATAGCGGTTTGACTCACGGGGATTTCCAAGTCTCCA CCCCATTGACGTCAATGGGAGTTTGTTTTGGCACCAAAATC AACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAACAACTCCGCCCCATTG ACGCAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATAT AAGCAGAGCTcgtttagtgaaccggggtctctctggttagaccagatctgagcctgggag ctctctggctaactagggaacccactgcttaagcctcaataaagcttgccttgagtgcttcaagtagtg tgtgcccgtctgttgtgtgactctggtaactagagatccctcagacccttttagtcagtgtggaaaatct ctagcagtggcgcccgaacagggacctgaaagcgaaagggaaaccagagctctctcgacgcag gactcggcttgctgaagcgcgcacggcaagaggcgaggggcggcgactggtgagtacgccaaa aattttgactagcggaggctagaaggagagagatgggtgcgagagcgtcagtattaagcggggg agaattagatcgcgatgggaaaaaattcggttaaggccagggggaaagaaaaaatataaattaaaa catatagtatgggcaagcagggagctagaacgattcgcagttaatcctggcctgttagaaacatcag aaggctgtagacaaatactgggacagctacaaccatcccttcagacaggatcagaagaacttagat cattatataatacagtagcaaccctctattgtgtgcatcaaaggatagagataaaagacaccaagga agctttagacaagatagaggaagagcaaaacaaaagtaagaccaccgcacagcaagcggccgct gatcttcagacctggaggaggagatatgagggacaattggagaagtgaattatataaatataaagta gtaaaaattgaaccattaggagtagcacccaccaaggcaaagagaagagtggtgcagagagaaa aaagagcagtgggaataggagctttgttccttgggttcttgggagcagcaggaagcactatgggcg cagcctcaatgacgctgacggtacaggccagacaattattgtctggtatagtgcagcagcagaaca atttgctgagggctattgaggcgcaacagcatctgttgcaactcacagtctggggcatcaagcagct ccaggcaagaatcctggctgtggaaagatacctaaaggatcaacagctcctggggatttggggttg ctctggaaaactcatttgcaccactgctgtgccttggaatgctagttggagtaataaatctctggaaca gatttggaatcacacgacctggatggagtgggacagagaaattaacaattacacaagcttaatacac tccttaattgaagaatcgcaaaaccagcaagaaaagaatgaacaagaattattggaattagataaat gggcaagtttgtggaattggtttaacataacaaattggctgtggtatataaaattattcataatgatagta ggaggcttggtaggtttaagaatagtttttgctgtactttctatagtgaatagagttaggcagggatatt caccattatcgtttcagacccacctcccaaccccgaggggacccgacaggcccgaaggaatagaa gaagaaggtggagagagagacagagacagatccattcgattagtgaacggatctcgacggtatcg gttaacttttaaaagaaaaggggggattgggggtacagtgcaggggaaagaatagtagacataat agcaacagacatacaaactaaagaattacaaaaacaaattacaaaaattcaaaattttggctcccgat

		cgttgcgttacacacacaattactgctgatcgagtgtagccttcccacagtccccgagaagttgggg ggaggggtcggcaattgaaccggtgcctagagaaggtggcgcggggtaaactgggaaagtgat gtcgtgtactggctccgccttttcccgagggtgggggagaaccgtatataagtgcagtagtcgccg tgaacgttcttttcgcaacgggtttgccgccagaacacaggtaagtgccgtgtgtggttcccgcgg gcctggcctctttacgggttatggcccttgcgtgccttgaattacttccacgcccctggctgcagtacg tgattcttgatcccgagcttcgggttggaagtgggtgggagagttcgaggccttgcgcttaaggagc cccttcgcctcgtgcttgagttgaggcctggcttgggcgctggggccgccgcgtgcgaatctggtg gcaccttcgcgcctgtctcgctgctttcgataagtctctagccatttaaaatttttgatgacctgctgcga cgctttttttctggcaagatagtcttgtaaatgcgggccaagatgtgcacactggtatttcggttttgggg gccgcgggcggcgacggggcccgtgcgtcccagcgcacatgttcggcgaggcggggcctgcg agcgcggccaccgagaatcggacgggggtagtctcaagctggccggcctgctctggtgcctggc ctcgcgccgccgtgtatcgccccgccctgggcggcaaggctggcccggtcggcaccagttgcgt gagcggaaagatggccgcttcccggccctgctgcagggagctcaaaatggaggacgcggcgct cgggagagcgggcgggtgagtcacccacacaaaggaaaagggcctttccgtcctcagccgtcgc ttcatgtgactccacggagtaccgggcgccgtccaggcacctcgattagttctcgagcttttggagta cgtcgtctttaggttgggggggagggttttatgcgatggagtttccccacactgagtgggtggagac tgaagttaggccagcttggcacttgatgtaattctccttggaatttgccctttttgagtttggatcttggtt cattctcaagcctcagacagtggttcaaagttttttCTTCCATTTCAGGTGTCGTG AtctagacgccaccATGTCTCGCTCCGTGGCCTTAGCTGTGCTCGC GCTACTCTCTCTTTCTGGCCTAGAGGCTGTTATGGCTCCGCG GACTTTAATTTTAGGTGGTGGCGGATCCGGTGGAGGCGGTT CTGGTGGAGGCGGCTCCATCCAGCGTACGCCAAAGATTCAG GTTTACTCACGTCATCCAGCAGAGAATGGAAAGTCAAATTT CCTGAATTGCTATGTGTCTGGGTTTCATCCATCCGACATTGA AGTTGACTTACTGAAGAATGGAGAGAGAATTGAAAAAGTG GAGCATTCAGACTTGTCTTTCAGCAAGGACTGGTCTTTCTAT CTCTTGTACTACACTGAATTCACCCCCACTGAAAAAGATGA GTATGCCTGCCGTGTGAACCATGTGACTTTGTCACAGCCCA AGATAGTTAAGTGGGATCGCGACATGGGTGGTGGCGGTTCT GGTGGTGGCGGTAGTGGCGGCGGAGGAAGCGGTGGTGGCG GTTCCGGATCTCACTCCTTGAAGTATTTCCACACTTCCGTGT CCCGGCCCGGCCGCGGGGAGCCCCGCTTCATCTCTGTGGGC TACGTGGACGACACCCAGTTCGTGCGCTTCGACAACGACGC CGCGAGTCCGAGGATGGTGCCGCGGGCGCCGTGGATGGAG CAGGAGGGGTCAGAGTATTGGGACCGGGAGACACGGAGCG

		CCAGGGACACCGCACAGATTTTCCGAGTGAACCTGCGGACG CTGCGCGGCTACTACAATCAGAGCGAGGCCGGGTCTCACAC CCTGCAGTGGATGCATGGCTGCGAGCTGGGGCCCGACAGGC GCTTCCTCCGCGGGTATGAACAGTTCGCCTACGACGGCAAG GATTATCTCACCCTGAATGAGGACCTGCGCTCCTGGACCGC GGTGGACACGGCGGCTCAGATCTCCGAGCAAAAGTCAAAT GATGCCTCTGAGGCGGAGCACCAGAGAGCCTACCTGGAAG ACACATGCGTGGAGTGGCTCCACAAATACCTGGAGAAGGG GAAGGAGACGCTGCTTCACCTGGAGCCCCCAAAGACACAC GTGACTCACCACCCCATCTCTGACCATGAGGCCACCCTGAG GTGCTGGGCTCTGGGCTTCTACCCTGCGGAGATCACACTGA CCTGGCAGCAGGATGGGGAGGGCCATACCCAGGACACGGA GCTCGTGGAGACCAGGCCTGCTGGGGATGGAACCTTCCAGA AGTGGGCAGCTGTGGTGGTGCCTTCTGGAGAGGAGCAGAG ATACACGTGCCATGTGCAGCATGAGGGGCTACCCGAGCCCG TCACCCTGAGATGGAAGCCGGCTTCCCAGCCCACCATCCCC ATCGTGGGCATCATTGCTGGCCTGGTTCTCCTTGGATCTGTG GTCTCTGGAGCTGTGGTTGCTGCTGTGATATGGAGGAAGAA GAGCTCAGGTGGAAAAGGAGGGAGCTACTATAAGGCTGAG TGGAGCGACAGTGCCCAGGGGTCTGAGTCTCACAGCTTGTA Aaagtagaagttgtctcctcctgcactgactgactgatacaatcgatttctggatccgcaggcctctg ctagaagttgtctcctcctgcactgactgactgatacaatcgatttctggatccgcaggcctctgctag cttgactgactgagtcgacAATCAACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAA AGATTGACTGGTATTCTTAACTATGTTGCTCCTTTTACGCTA TGTGGATACGCTGCTTTAATGCCTTTGTATCATGCTATTGCT TCCCGTATGGCTTTCATTTTCTCCTCCTTGTATAAATCCTGGT TGCTGTCTCTTTATGAGGAGTTGTGGCCCGTTGTCAGGCAAC GTGGCGTGGTGTGCACTGTGTTTGCTGACGCAACCCCCACT GGTTGGGGCATTGCCACCACCTGTCAGCTCCTTTCCGGGACT TTCGCTTTCCCCCTCCCTATTGCCACGGCGGAACTCATCGCC GCCTGCCTTGCCCGCTGCTGGACAGGGGCTCGGCTGTTGGG CACTGACAATTCCGTGGTGTTGTCGGGGAAGCTGACGTCCT TTCCATGGCTGCTCGCCTGTGTTGCCACCTGGATTCTGCGCG GGACGTCCTTCTGCTACGTCCCTTCGGCCCTCAATCCAGCGG ACCTTCCTTCCCGCGGCCTGCTGCCGGCTCTGCGGCCTCTTC

		CGCGTCTTCGCCTTCGCCCTCAGACGAGTCGGATCTCCCTTT GGGCcgcctccccgcctggaattcgagctcggtacctttaagaccaatgacttacaaggcagct gtagatcttagccacttttttaaaagaaaaggggggactggaagggctaattcactcccaacgaaga caagatctgctttttgcttgtactgggtctctctggttagaccagatctgagcctgggagctctctggct aactagggaacccactgcttaagcctcaataaagcttgccttgagtgcttcaagtagtgtgtgcccgt ctgttgtgtgactctggtaactagagatccctcagacccttttagtcagtgtggaaaatctctagcagtc ctggccaacgtgagcaccgtgctgacctccaaatatcgttaagctggagcctgggagccggcctg gccctccgcccccccccaccccccgcagcccaccccctggtctttgaataaagtctgagtgagtggccg acagtgcccgtggagttctcgtgacctgaggtgcagggccggcgctagggacacgtccgtgcac gtgccgaggcccccctgtgcagctgcaagggacaggcctagccctgcaggcctaactccgcccat cccgcccctaactccgcccagttccgcccattctccgcctcatggctgactaatttttttatttatgcag aggccgaggccgcctcggcctctgagctattccagaagtagtgaggacgctttttggaggccgag gcttttgcaaagatcgaacaagagacaggacctgcaggttaattaaatttaaatcatgtgagcaaaa ggccagcaaaaggccaggaaccgtaaaaaggccgcgttgctggcgtttttccataggctccgccc ccctgacgagcatcacaaaaatcgacgctcaagtcagaggtggcgaaacccgacaggactataa agataccaggcgtttcccccctggaagctccctcgtgcgctctcctgttccgaccctgccgcttaccg gatacctgtccgcctttctcccttcgggaagcgtggcgctttctcatagctcacgctgtaggtatctca gttcggtgtaggtcgttcgctccaagctgggctgtgtgcacgaaccccccgttcagcccgaccgct gcgccttatccggtaactatcgtcttgagtccaacccggtaagacacgacttatcgccactggcagc agccactggtaacaggattagcagagcgaggtatgtaggcggtgctacagagttcttgaagtggtg gcctaactacggctacactagaagaacagtatttggtatctgcgctctgctgaagccagttaccttcg gaaaaagagttggtagctcttgatccggcaaacaaaccaccgctggtagcggtggtttttttgtttgc aagcagcagattacgcgcagaaaaaaaggatctcaagaagatcctttgatcttttctacggggtctg acgctcagtggaacgaaaactcacgttaagggattttggtcatgagattatcaaaaaggatcttcacc tagatccttttaaattaaaaatgaagttttaaatcaatctaaagtatatatgagtaaacttggtctgacagt taccaatgcttaatcagtgaggcacctatctcagcgatctgtctatttcgttcatccatagttgcatttaa atggccggcctggcgcgccgtttaaacctagatattgatagtctgatcggtcaacgtataatcgagtc ctagcttttgcaaacatctatcaagagacaggatcagcaggaggctttcgcatgagtattcaacatttc cgtgtcgcccttattccctttttgcggcattttgccttcctgtttttgctcacccagaaacgctggtgaaa gtaaaagatgctgaagatcagttgggtgcgcgagtgggttacatcgaactggatctcaacagcggt aagatccttgagagttttcgccccgaagaacgctttccaatgatgagcacttttaaagttctgctatgtg gcgcggtattatcccgtattgacgccgggcaagagcaactcggtcgccgcatacactattctcaga atgacttggttgagtattcaccagtcacagaaaagcatcttacggatggcatgacagtaagagaatta tgcagtgctgccataaccatgagtgataacactgcggccaacttacttctgacaacgattggaggac cgaaggagctaaccgctttttgcacaacatgggggatcatgtaactcgccttgatcgttgggaacc

		ggagctgaatgaagccataccaaacgacgagcgtgacaccacgatgcctgtagcaatggcaaca accttgcgtaaactattaactggcgaactacttactctagcttcccggcaacagttgatagactggatg gaggcggataaagttgcaggaccacttctgcgctcggcccttccggctggctggtttattgctgata aatctggagccggtgagcgtgggtctcgcggtatcattgcagcactggggccagatggtaagccct cccgtatcgtagttatctacacgacggggagtcaggcaactatggatgaacgaaatagacagatcg ctgagataggtgcctcactgattaagcattggtaaccgattctaggtgcattggcgcagaaaaaaat gcctgatgcgacgctgcgcgtcttatactcccacatatgccagattcagcaacggatacggcttccc caacttgcccacttccatacgtgtcctccttaccagaaatttatccttaagatcccgaatcgtttaaac
Иллюстративная укороченная направляющая РНК SpyCas9	1005	NNNNNNNNNNNNNNNNNNNGUUUUAGAGCUAGAAAUAG CAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCACGAAAGGGCA CCGAGUCGGUGCU
Пример иллюстративной модифицированной направляющей РНК SpyCas9	1006	mN*mN*mN*NNNNNNNNNNNNNNNNNGUUUUAGAmGmCm UmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGU CCGUUAUCACGAAAGGGCACCGAGUCGGmUmGmC*mU
G023521 Иллюстративная 91-мерная полная последовательность	1007	CGCCCAGGUCCUCACGUCUGGUUUUAGAGCUAGAAAUAGC AAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCACGAAAGGGCAC CGAGUCGGUGCU
G023521 Иллюстративная 91-мерная модифицированная	1008	mC*mG*mC*CCAGGUCCUCACGUCUGGUUUUAGAmGmCmU mAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUC CGUUAUCACGAAAGGGCACCGAGUCGGmUmGmC*mU

последовательность		
Направляющие каркасы 90-мерные	1009	GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCACGAAAGGGCACCGAGUCGGUGC
Направляющий 90-мерный каркас с модификацией	1010	GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCACGAAAGGGCACCGAGUCGG*mU*mG*mC
Направляющий 90-мерный каркас с модификацией	1011	GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmCmGmAmAmAmGmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmG*mU*mG*mC
Направляющий 88-мерный каркас с модификацией	1012	GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGGCACCGAGUCGG*mU*mG*mC
Направляющие каркасы 88-мерные	1013	GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAAAAUGGCACCGAGUCGGUGC
Направляющий 88-мерный каркас с модификацией	1014	GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAAAAUGGCACCGAGUCGG*mU*mG*mC
Направляющий 88-	1015	GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmAmAmUmGmGmCmA

мерный каркас с модификацией		mCmCmGmAmGmUmCmGmG*mU*mG*mC
Направляющий каркас	1016	GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
Направляющий каркас	1017	mN*mN*mN*NNNNNNNNNNNNNNNNNGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU

(В каждой из последовательностей, приведенных в таблице выше или описанных в настоящем документе, модифицированная последовательность может быть немодифицированной или модифицирована альтернативным образом.)

ПРИМЕРЫ

[00380] Следующие примеры представлены для иллюстрации некоторых описанных вариантов осуществления и не должны рассматриваться как ограничивающие каким-либо образом объем данного изобретения.

Пример 1. Общие способы

1.1. Получение липидных наночастиц

[00381] В общем, липидные компоненты растворяли в 100% этаноле в различных молярных соотношениях. Нагрузку РНК (*например*, мРНК Cas9 и онРНК) растворяли в 25 мМ цитратном буфере, 100 мМ NaCl, pH 5,0, в результате чего концентрация нагрузки РНК составляла приблизительно 0,45 мг/мл.

[00382] Составные композиции липида и нуклеиновой кислоты содержали ионизируемый липид A ((9Z,12Z)-3-((4,4-бис(октилокси)бутаноил)окси)-2-((((3-(диэтиламино)пропокси)карбонил)окси)метил)пропилоктадека-9,12-диеноат, также называемый 3-((4,4-бис(октилокси)бутаноил)окси)-2-((((3-(диэтиламино)пропокси)карбонил)окси)метил)пропил(9Z,12Z)-октадека-9,12-диеноат), холестерин, DSPC и PEG2k-DMG в молярном соотношении 50:38:9:3, соответственно. Составные композиции липида и нуклеиновой кислоты были составлены с молярным соотношением амина липида к фосфату РНК (N:P) около 6 и соотношением нРНК к мРНК 1:1 или 1:2 по массе.

[00383] Композиции LNP были приготовлены с использованием метода перекрестного потока с использованием ударно-струйного смешения липида в этаноле с двумя объемами растворов РНК и одним объемом воды. Липиды в этаноле смешивали перекрестным смешиванием с двумя объемами раствора РНК. Четвертый поток воды

смешивали с выходным потоком перекрестного смешивания через Т-образное соединение (*см.* WO 2016010840, Фиг. 2). Композиции LNP выдерживали в течение 1 часа при комнатной температуре и дополнительно разбавляли водой (приблизительно 1:1 v/v). Композиции LNP концентрировали с применением тангенциальной проточной фильтрации на картридже с плоским листом (Sartorius, 100 кДа MWCO) и заменяли буфер с применением колонок для обессоливания PD-10 (GE) на 50 мМ Трис, 45 мМ NaCl, 5% (масс./об.) сахарозы, pH 7,5 (TSS). Альтернативно, LNP необязательно концентрировали с применением центрифужного фильтра Amicon 100 кДа, а буфер заменяли с применением колонок для обессоливания PD-10 (GE) на TSS. Полученную смесь затем фильтровали с применением 0,2 мкм стерильного фильтра. Конечный LNP хранили при 4°C или -80°C до дальнейшего применения.

1,2. ТРАНСКРИПЦИЯ IN VITRO («IVT») МРНК

[00384] Кэпированную и полиаденилированную мРНК, содержащую N1-метил-псевдо-U, получали путем транскрипции in vitro с применением матрицы линеаризованной плазмидной ДНК и РНК-полимеразы Т7. Плазмидную ДНК, содержащую промотор Т7, последовательность для транскрипции и последовательность полиаденилирования, линеаризовали путем инкубации при 37°C в течение 2 часов с XbaI при следующих условиях: 200 нг/мкл плазмиды, 2 ед/мкл XbaI (NEB) и 1x реакционный буфер. XbaI инактивировали нагреванием реакционной смеси при 65°C в течение 20 мин. Линеаризованную плазмиду очищали от фермента и солей буфера. Реакционную смесь IVT для получения модифицированной мРНК проводили путем инкубации при 37 °C в течение 1,5-4 часов в следующих условиях: 50 нг/ мкл линеаризованной плазмиды; 2-5 мМ каждого из GTP, ATP, CTP и N1-метил псевдо-UTP (Trilink); 10-25 мМ ARCA (Trilink); 5 ед/ мкл Т7 РНК-полимеразы (NEB); 1 ед/ мкл ингибитора мышиной РНКазы (NEB); 0,004 ед/ мкл неорганической пирофосфатазы E.coli (NEB); и 1x реакционный буфер. TURBO ДНКазу (ThermoFisher) добавляли до конечной концентрации 0,01 Ед/мкл и реакционную смесь инкубировали в течение дополнительных 30 минут для удаления матрицы ДНК. мРНК очищали с применением набора для очистки транскрипции MegaClear (ThermoFisher) или набора RNeasy Maxi (Qiagen) в соответствии с протоколами производителей. Альтернативно, мРНК очищали по протоколу преципитации, за которым в некоторых случаях следовала очистка на основе ВЭЖХ. Вкратце, после расщепления ДНКазой мРНК очищают с применением преципитации LiCl, преципитации ацетатом аммония и преципитации ацетатом натрия. В случае мРНК, очищенной ВЭЖХ, после преципитации LiCl и восстановления мРНК очищали с помощью ОФ-ИП ВЭЖХ (см., *например*, Kariko, et al. Nucleic Acids Research, 2011, Vol. 39, No. 21 e142). Фракции, выбранные для объединения, объединяли и обессоливали осаждением ацетатом натрия/этанола, как описано выше. В еще одном альтернативном методе мРНК очищали методом преципитации LiCl с последующей дополнительной очисткой фильтрацией с тангенциальным потоком. Концентрации РНК определяли путем измерения поглощения света при 260 нм (Nanodrop), а транскрипты анализировали с помощью капиллярного

электрофореза с помощью Bioanlayzer (Agilent).

[00385] мРНК Cas9 Streptococcus pyogenes («Spy») получали из плазмидной ДНК, кодирующей открытую рамку считывания в соответствии с SEQ ID NO: 801-803 (см. последовательности в **таблице 4**). мРНК BC22n получали из плазмидной ДНК, кодирующей открытую рамку считывания в соответствии с SEQ ID NO: 804-805. мРНК BC22 получали из плазмидной ДНК, кодирующей открытую рамку считывания в соответствии с SEQ ID NO: 806. мРНК UGI получали из плазмидной ДНК, кодирующей открытую рамку считывания в соответствии с SEQ ID NO: 807-808. Когда SEQ ID NO: 801-808 упоминаются ниже в отношении РНК, подразумевается, что T следует заменить на U (которые представляли собой N1-метилпсевдоуридины, как описано выше). РНК-мессенджеры, применяемые в примерах, включают 5'-кэп и 3'-область полиаденилирования, например, до 100 нуклеотидов, и идентифицируются с помощью SEQ ID NO: 801-808 в **Таблице 4.**

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

[00386] Геномную ДНК экстрагировали с применением раствора для экстракции ДНК QuickExtract™ (Lucigen, кат. QE09050) в соответствии с протоколом производителя.

[00387] Чтобы количественно определить эффективность редактирования в целевом месте генома, было использовано глубокое секвенирование для выявления наличия вставок и делеций, введенных при редактировании генов. Праймеры для ПЦР конструировали вокруг целевого сайта внутри интересующего гена (например, TRAC) и амплифицировали интересующую область генома. Схема последовательности праймера была выполнена в соответствии со стандартом в данной области техники.

[00388] Дополнительную PCR проводили в соответствии с протоколами производителя (Illumina) для добавления химических компонентов для секвенирования. Ампликоны секвенировали на приборе Illumina MiSeq. Чтения были выровнены в отношении эталонного генома человека (например, hg38) после исключения тех, которые имели низкие баллы качества. Считывания, которые перекрывали интересующую целевую область, повторно выравнивали с локальной последовательностью генома для улучшения выравнивания. Затем рассчитывали количество считываний дикого типа по сравнению с количеством считываний, содержащих мутации C-в-T, мутации C-в-A/G или инделы. Вставки и делеции оценивали в области 20 п.н. с центром в предполагаемом сайте расщепления Cas9. Процент инделов рассчитывается как общее количество прочтений секвенирования с одним или более вставленными или удаленными основаниями в оцениваемой области 20 п.н., деленное на общее количество прочтений секвенирования, включая дикий тип. Процент преобразования C-в-T или C-в-A/G оценивали в области 40 п.н., включая 10 п.н. выше и 10 п.н. ниже целевой последовательности онРНК длиной 20 п.н. Процент редактирования C-в-T определяли как общее количество считываний секвенирования с одной или большим количеством мутаций C-в-T в области 40 п.н., деленное на общее количество считываний секвенирования, включая дикий тип.

Аналогичным образом рассчитывают процент мутаций C-в-A/G.

Пример 2. Скрининг CIITA-направленных РНК

[00389] CIITA-направленные РНК подвергали скринингу на эффективность в Т-клетках путем оценки потери экспрессии MHC класса II на клеточной поверхности. Процент Т-клеток, отрицательных в отношении белка MHC класса II («% отрицательных по MHC II»), анализировали после редактирования CIITA.

2.1. Редактирование Т-клеток рибонуклеопротеином

[00390] Редактирующую активность Cas9 оценивали с помощью электропорации рибонуклеопротеина Cas9 (RNP). После размораживания Т-клетки Pan CD3+ высевали с плотностью $0,5\times10^{\wedge6}$ клеток/мл в среду RPMI для Т-клеток, состоящую из RPMI 1640 (Invitrogen, кат. 22400-089), содержащей 5% (об./об.) эмбриональной бычьей сыворотки, 1x глутамакса (Gibco, кат. 35050-061), 50 мкМ 2-меркаптоэтанола, 100 мкМ заменимых аминокислот (Invitrogen, кат. 11140-050), 1 мМ пирувата натрия, 10 мМ буфера HEPES, 1% пенициллин-стрептомицина и 100 ЕД/мл рекомбинантного интерлейкина-2 человека (Peprotech, кат. 200-02). Т-клетки активировали с помощью Dynabeads™ Human T-Expander CD3/CD28 (3:1, Invitrogen). Клетки размножали в среде для Т-клеток RPMI в течение 72 часов перед трансфекцией RNP.

[00391] RNP получали путем предварительного отжига отдельных CIITA, нацеленных на crРНК и trРНК (SEQ ID NO: 215) путем смешивания эквивалентных количеств реагента и инкубации при 95 °C в течение 2 мин и охлаждения до комнатной температуры. Двойную направляющую (днРНК), состоящую из предварительно отожженных crРНК и trРНК, инкубировали с рекомбинантным белком Spy Cas9 (SEQ ID NO: 800) с образованием рибонуклеопротеинового (RNP) комплекса. Готовили смесь RNP из 50 мкМ днРНК и 50 мкМ белка Cas9-NLS и инкубировали при 25 °C в течение 10 минут. Пять мкл смеси RNP объединяли со 100 000 клеток в 20 мкл буфера для электропорации P3 (Lonza). 22 мкл смеси RNP/клеток переносили в соответствующие лунки 96-луночного планшета для электропорации Lonza Shuttle. Клетки подвергали электропорации в трех повторностях с кодом импульса производителя. Среду для Т-клеток RPMI добавляли к клеткам сразу после электропорации. Затем электропорированные Т-клетки культивировали. Через два дня после редактирования часть электропорированных Т-клеток собирали для секвенирования NGS.

2.2. Проточная цитометрия

[00392] На 7-й день после редактирования Т-клетки фенотипировали с помощью проточной цитометрии для определения экспрессии белка MHC класса II. Вкратце, Т-клетки инкубировали с антителами, нацеленными на HLA-DR (BioLegend® кат. № 307622), и с изотипическим контролем-AF647 (BioLegend® кат. № 400234). Затем клетки промывали, обрабатывали с помощью проточного цитометра Cytoflex (Beckman Coulter) и анализировали с применением программного пакета FlowJo. Т-клетки были отобраны на основе размера, формы, жизнеспособности и экспрессии MHC класса II. Образцы ДНК подвергали ПЦР и последующему NGS-анализу. В **таблице 5** и на **фиг. 1A** показаны

результаты процентного редактирования после редактирования CIITA с использованием различных направляющих в $CD3^+$ Т-клетках. В **таблице 5** и на **фиг. 1A** показаны результаты для процента MHC-II-негативных клеток с использованием HLA-DR в качестве маркера после редактирования CIITA с использованием различных направляющих в Т-клетках.

[00393] **Таблица 5 - Процент редактирования и процент HLA-DR-клеток после редактирования CIITA**

	Редактирование				**Экспрессия MHC класса II, HLA-DR**			
	Донор B		**Донор 26**		**Донор B**		**Донор 26**	
Направляющая	**% редактирования**	**SD**	**% редактирования**	**SD**	**% отр**	**SD**	**% отр**	**SD**
CR002966	47,1	3,9	50,9	1,7	42,9	2,0	38,0	3,9
CR002959	37,1	1,7	42,2	3,8	15,8	3,2	3,9	5,2
CR002961	16,4	1,1	18,4	1,8	3,4	2,9	3,7	3,2
CR002967	23,9	1,0	29,8	0,3	23,7	5,0	19,7	6,5
CR002971	13,3	0,4	13,8	1,1	6,9	3,6	10,5	4,0
CR002991	13,6	0,5	15,9	1,0	10,4	1,0	14,4	3,4
CR002995	Нет данных	Нет данных	8,5	0,6	7,6	4,3	-6,6	6,3
CR003009	7,9	0,3	7,2	0,8	11,6	3,0	0,0	8,4
CR003011	9,9	1,2	13,0	0,3	13,1	1,9	5,4	4,0
CR003014	17,9	1,0	17,1	1,6	13,4	0,6	5,4	2,3
CR007938	58,1	2,2	57,5	2,8	22,2	2,3	11,6	3,3
CR007955	11,6	1,0	13,7	1,2	6,3	2,7	-1,8	5,5
CR007982	24,2	1,1	29,9	4,9	38,2	1,9	35,6	1,5
CR007994	12,6	0,8	12,6	0,8	20,7	2,5	5,5	4,4
CR007997	11,4	1,6	9,2	2,0	11,7	1,2	4,9	5,5
CR009188	5,5	1,0	6,0	0,2	-0,7	1,6	-8,5	6,2
CR009202	8,2	0,1	9,4	0,8	6,8	5,0	5,4	3,3
CR009206	8,3	0,9	9,3	0,6	15,8	4,1	13,0	4,4
CR009208	7,9	1,0	6,8	0,5	8,3	2,2	12,4	1,4
CR009211	4,4	0,8	4,7	0,2	0,9	1,7	-3,1	4,6

CR009217	23,2	1,8	29,0	3,2	29,0	3,3	29,6	0,6
CR009229	17,4	1,1	19,6	0,5	18,7	3,0	19,0	3,4
CR009230	5,2	0,5	6,2	0,9	6,3	4,3	28,1	19,7
CR009234	19,9	0,6	23,7	1,4	17,7	0,4	12,0	5,1
CR009235	11,9	0,5	10,9	0,8	13,8	1,2	1,2	5,6
CR009238	9,0	1,0	13,4	1,7	15,4	1,7	11,4	1,8

Пример 3 - Ответ редактирования онРНК на дозу

3.1 Подготовка Т-клеток

[00394] Аферез здоровых доноров был получен коммерчески (Hemacare), клетки были промыты и ресуспендированы в буфере PBS/ЭДТА CliniMACS® (Miltenyi Biotec, кат. № 130-070-525) на устройстве LOVO. Т-клетки выделяли с помощью положительной селекции с использованием магнитных гранул с CD4 и CD8 (Miltenyi Biotec кат. № 130-030-401/130-030-801) с использованием одноразовых наборов CliniMACS® Plus и CliniMACS® LS. Аликвоты Т-клеток распределяли по флаконам и криоконсервировали в составе Cryostor® CS10 в соотношении 1:1 (StemCell Technologies кат. № 07930) и Plasmalyte A (Baxter кат. № 2B2522X) для дальнейшего использования.

[00395] После размораживания Т-клетки высевали с плотностью $1,5\times10^{\wedge 6}$ клеток/мл в среду на основе OpTmizer, содержащую CTS OpTmizer T Cell Expansion SFM (Gibco, кат. № A3705001), 5% сыворотки AB человека (Gemini, кат. № 100-512) 1% пенициллин-стрептомицина, 1X глутамакса, 10 мМ HEPES, 200 ЕД/мл рекомбинантного интерлейкина-2 человека (Peprotech, кат. № 200-02), 5 нг/мл рекомбинантного интерлейкина 7 человека (Peprotech, кат. № 200-07) и 5 нг/мл рекомбинантного интерлейкина 15 человека (Peprotech, кат. 200-15). Т-клетки активировали с помощью TransAct™ (разведение 1:100, Miltenyi Biotec) в этой среде в течение 48 часов.

3.2 Редактирование Т-клеток

[00396] Композиции LNP, содержащие мРНК, кодирующую белок Cas9 (SEQ ID NO: 802) и онРНК, нацеленную на CIITA, были приготовлены, как описано в **Примере 1**. Каждый препарат LNP инкубировали в среде на основе OpTmizer с цитокинами, как описано выше, с добавлением 10 мкг/мл рекомбинантного ApoE3 человека (Peprotech, кат. 350-02) в течение 5 минут при 37 °C. Через 48 часов после активации Т-клетки промывали и суспендировали в среде OpTmizer с цитокинами, как описано, но без сыворотки человека. Предварительно инкубированную смесь LNP добавляли в каждую лунку, чтобы получить конечную концентрацию, как описано в **таблице 6**. Также была включена контрольная группа, включающая неотредактированные Т-клетки (без LNP). Через 24 часа Т-клетки собирали, промывали и культивировали в течение 7 дней в среде на основе OpTmizer, а затем собирали для оценки с помощью NGS и проточной цитометрии. Все группы были сделаны с повторными лунками (n=2). Размноженные Т-клетки подвергали криоконсервации для функциональных анализов. Анализ NGS выполняли, как описано в **Примере 1**, для одного набора повторных образцов. В **таблице 6** и на **фиг. 2A** показаны

результаты процентного редактирования после редактирования CIITA с использованием различных направляющих в Т-клетках.

[00397] **Таблица 6 - Процент редактирования инделов после редактирования CIITA в общем количестве Т-клеток (n=1)**

Доза LNP (мкг/мл)	G013674	G013675	G013676
5	99,5	99,6	99,6
2,5	99,4	99,5	98,8
1,25	99,2	98,6	96,8
0,63	94,6	80	72,8
0,31	67,5	34,2	29,2
0,16	40	11,8	11
0,08	14,6	3,8	3,8
0,04	5,2	1,6	1,5

3.3 Проточная цитометрия

[00398] На 7-й день после редактирования Т-клетки фенотипировали с помощью проточной цитометрии для определения экспрессии белка MHC класса II. Вкратце, Т-клетки инкубировали с антителом, нацеленным на HLA-DR DP-DQ (Biolegend, кат. 361706) перед промывкой и анализом на проточном цитометре Cytoflex (Beckman Coulter). Анализ данных был выполнен с использованием пакета программного обеспечения FlowJo. Т-клетки были отобраны на основе размера, формы, жизнеспособности и экспрессии MHC класса II (HLA-DRDP-DQ). В **таблице 7** и на **фиг. 2B** показаны результаты для процента MHC-II-негативных клеток (HLA-DR-DP-DQ-) после редактирования CIITA с использованием различных направляющих для CD4+, CD8+ или общего числа Т-клеток.

[00399] **Таблица 7 - Средний процент клеток, отрицательных по MHC класса II после редактирования CIITA**

Тип клеток	Доза LNP (мкг/мл)	G013674		G013675		G013676		Необработанные	
		% отр	SD	% отр	SD	% отр	SD	% отр	SD
Всего Т-клеток	0,04	21,8	0,1	20,8	0,4	19,5	0,5	17,2	0,3
	0,08	23,3	1,4	22,8	1,0	21,4	1,1	18,7	1,5
	0,16	29,5	2,2	24,7	0,1	23,7	0,8	19,5	1,3
	0,31	44,7	1,6	37,8	1,9	30,4	3,8	19,4	0,7
	0,63	63,8	0,1	76,2	0,9	61,6	6,4	20,4	1,2
	1,25	67,1	0,6	93,4	0,7	91,8	0,1	20,6	1,2

	2,50	65,6	0,1	94,4	0,8	94,7	0,1	19,0	1,7
	5,00	63,3	1,0	92,6	0,6	94,0	0,4	19,4	0,5
CD4+	0,04	31,5	0,4	30,5	1,1	30,0	0,9	27,6	2,1
	0,08	33,9	0,8	32,9	0,0	31,4	1,1	28,1	2,5
	0,16	39,1	2,4	34,6	0,8	33,8	0,4	29,4	2,4
	0,31	52,2	1,2	47,7	1,1	40,7	3,5	29,9	0,0
	0,63	70,5	0,6	80,1	0,1	68,5	5,0	31,1	1,9
	1,25	73,1	1,3	95,2	0,7	94,1	0,1	30,3	2,3
	2,50	72,4	0,7	96,1	0,6	96,3	0,4	29,5	3,2
	5,00	69,4	0,1	94,9	0,0	96,5	0,6	30,5	1,4
CD8+	0,04	17,4	0,1	16,4	0,1	14,7	0,2	14,9	0,3
	0,08	17,7	1,6	17,5	1,6	16,2	1,2	14,4	1,3
	0,16	24,7	2,3	19,8	0,4	18,6	0,8	16,2	0,7
	0,31	41,1	2,0	32,8	2,5	25,2	4,0	15,4	1,1
	0,63	61,2	0,1	75,1	1,1	58,7	7,2	14,6	1,1
	1,25	64,8	0,4	93,2	0,6	91,4	0,3	15,0	0,8
	2,5	63,1	0,1	94,2	0,6	94,8	0,1	14,3	1,0
	5	61,8	1,1	92,4	0,8	93,7	0,4	13,2	0,4

Пример 4- CIITA-направленные РНК

4.1 Подготовка Т-клеток

[00400] Аферез здоровых доноров был получен коммерчески (Hemacare), клетки были промыты и ресуспендированы в 2% буфере PBS/ЭДТА. Т-клетки выделяли на MultiMACS (Miltenyi Biotec кат. № 130-098-637) путем положительной селекции с использованием набора StraightFrom® Leukopak® CD4/CD8 MicroBead Kit (Miltenyi Biotec кат. № 130-122-352). Аликвоты Т-клеток распределяли по флаконам и криоконсервировали в составе Cryostor CS10 в соотношении Cryostor® (StemCell Technologies кат. № 07930).

[00401] После размораживания Т-клетки высевали с плотностью 1,0×10 ^6 клеток/мл в основную среду для Т-клеток, состоящую из среды для гемопоэтических клеток без сыворотки X-VIVO 15™ (Lonza Bioscience), содержащей 5% (об./об.) фетальной бычьей сыворотки, 55 мкМ 2-меркаптоэтанола, 10 мМ N-ацетил-L-(+)-цистеина, 10 ЕД/мл пенициллин-стрептомицина, в дополнение к 1X цитокинов (200 ЕД/мл рекомбинантного интерлейкина-2 человека, 5 мкг/мл рекомбинантного интерлейкина-7 человека и 5 мкг/мл рекомбинантного интерлейкина-15 человека). Т-клетки активировали с помощью TransAct™ (разведение 1:100, Miltenyi Biotec). Клетки размножали в основной среде для Т-клеток, содержащей TransAct™, в течение 48 часов перед электропорацией.

4.2 Редактирование Т-клеток рибонуклеопротеином

[00402] RNP получали путем предварительного отжига отдельных crРНК и trРНК путем смешивания эквивалентных количеств реагента и инкубации при 95°C в течение 2 мин с последующим мгновенным охлаждением. Двойную направляющую (днРНК), состоящую из предварительно отожженных crРНК и trРНК, инкубировали с белком Spy Cas9 (SEQ ID NO: 800) при молярном соотношении днРНК/белок 2:1 с образованием комплекса рибонуклеопротеина (RNP). $CD3^+$ Т-клетки трансфицировали в двух повторностях RNP в концентрациях, указанных в Таблице 8, с использованием набора P3 Primary Cell 96-well Nucleofector™ (Lonza, кат. V4SP-3960) используя импульсный код производителя. Т-клеточную среду добавляли к клеткам сразу после нуклеофекции и культивировали в течение 2 дней или более.

[00403] Через четыре дня после нуклеофекции получали геномную ДНК, как описано в примере 1, и проводили анализ NGS. В **таблице 8** и на **фиг. 3A** показаны результаты процентного редактирования после редактирования CIITA с использованием различных направляющих в $CD3^+$ Т-клетках.

4.3. Проточная цитометрия

[00404] На 10-й день после редактирования Т-клетки фенотипировали с помощью проточной цитометрии для определения экспрессии белка MHC класса II. Вкратце, Т-клетки инкубировали в коктейле антител, нацеленных на HLA-DR-DP-DQ (Biolegend, кат. 361704) и CD3 (BioLegend, кат. 300322). Затем клетки промывали, обрабатывали с помощью проточного цитометра Cytoflex (Beckman Coulter) и анализировали с применением программного пакета FlowJo. Т-клетки были отобраны на основе размера, формы, жизнеспособности и экспрессии MHC класса II. В **таблице 8** и на **фиг. 3B** показаны результаты для процента MHC-II-негативных клеток после редактирования CIITA с использованием различных направляющих для $CD3^+$ Т-клеток.

[00405] **Таблица 8- редактирования и процент отрицательных клеток MHC-II после редактирования CIITA**

Направляющая	**RNP (мкМ)**	**% редактирование**	**SD**	**% MHCII нег**	**SD**
CR002961	0	0,2	0,1	6,7	0,7
	0,0625	5,0	0,2	13,2	0,9
	0,125	11,6	0,5	15,4	0,4
	0,25	23,3	2,1	14,6	0,6
	0,5	49,2	0,8	16,1	0,8
	0,75	65,9	1,9	21,2	0,4
	1	69,2	1,4	22,9	0,1
	1,5	81,9	0,3	25,4	0,1
CR009217	0	0,3	0,1	8,6	0,2

	0,0625	9,6	0,4	16,4	0,1
	0,125	19,2	0,4	20,6	0,6
	0,25	37,9	0,8	28,0	2,2
	0,5	65,2	1,8	48,1	0,7
	0,75	80,3	2,0	58,4	1,6
	1	82,8	3,3	65,8	0,4
	1,5	91,8	1,3	73,7	0,9
CR007982	0	0,1	0,0	7,4	0,0
	0,0625	8,9	0,1	15,0	2,8
	0,125	21,3	1,2	15,2	7,1
	0,25	39,3	3,0	25,5	0,2
	0,5	65,9	3,1	48,8	2,3
	0,75	80,0	1,8	59,3	1,3
	1	83,9	0,4	68,2	2,8
	1,5	92,3	0,5	71,3	5,2
CR007994	0	0,2	0,1	5,6	1,1
	0,0625	5,1	1,0	13,8	0,8
	0,125	9,7	0,2	14,7	0,5
	0,25	20,7	0,6	12,2	1,3
	0,5	46,7	2,4	30,8	1,5
	0,75	61,8	1,1	41,6	1,5
	1	70,2	3,5	50,5	2,1
	1,5	83,4	1,2	56,4	2,3

Пример 5 - Редактирование Т-клеток, CIITA-направленными РНК с Cas9 и BC22

5.1 Подготовка Т-клеток

[00406] Т-клетки редактировали в локусе CIITA с UGI в транс и либо BC22, либо Cas9, чтобы оценить влияние типа редактирования на антигены MHC класса II.

[00407] Т-клетки получали из лейкопака с использованием набора для выделения Т-клеток человека EasySep (технология стволовых клеток, кат. 17951) в соответствии с протоколом производителя. Т-клетки были криоконсервированы в среде для замораживания Cryostor CS10 (кат. 07930) для дальнейшего использования. После размораживания Т-клетки высевали с плотностью 1,0×10^6 клеток/мл в среду для Т-клеток R10, состоящую из RPMI 1640 (Corning, кат. 10-040-CV), содержащую 10% (об./об.) эмбриональной бычьей сыворотки, 2 мМ глутамакса (Gibco, кат. 35050-061), 22 мкМ 2-меркаптоэтанола, 100 мкМ заменимых аминокислот (Corning, кат. 25-025-Cl), 1 мМ пирувата натрия, 10 мМ буфера HEPES, 1% пенициллин-стрептомицина плюс 100 ЕД/мл

рекомбинантного интерлейкина-2 человека (Peprotech, кат. 200-02). Т-клетки активировали с помощью Dynabeads® Human T-Activator CD3/CD28 (Gibco, кат. 11141D). Клетки размножали в среде для Т-клеток в течении 72 часов до трансфекции мРНК.

5.2 Редактирование Т-клеток с помощью электропорации РНК

[00408] Растворы, содержащие мРНК, кодирующую белок Cas9 (SEQ ID NO: 801), BC22 (SEQ ID NO: 806) или UGI (SEQ ID NO: 807) готовили на стерильной воде. 50 мкМ CIITA, нацеленные на онРНК, удаляли из их планшетов для хранения и денатурировали в течение 2 минут при 95 °C перед охлаждением на льду. Через семьдесят два часа после активации Т-клетки собирали, центрифугировали и ресуспендировали в концентрации 12,5 × $10^{\wedge 6}$ Т-клеток/мл в буфере для электропорации P3 (Lonza). Для каждой лунки, предназначенной для электропорации, 1×$10^{\wedge 5}$ Т-клеток смешивали с 200 нг редактора мРНК, 200 нг мРНК UGI и 20 пмоль онРНК, как описано в **таблице 9**, в конечном объеме 20 мкл буфера для электропорации P3. Эту смесь в двух повторностях переносили на 96-луночный планшет Nucleofector™ и подвергали электропорации, используя импульсный код производителя. Электропорированные Т-клетки выдерживали в 180 мкл среды R10 плюс 100 ед/мл рекомбинантного интерлейкина-2 человека перед переносом в новый плоскодонный 96-луночный планшет. Полученный планшет инкубировали при 37°C в течение 4 дней. На 10-й день после редактирования клетки собирали для анализа проточной цитометрией и секвенирования NGS.

5.3 Проточная цитометрия и NGS-секвенирование

[00409] На 10-й день после редактирования Т-клетки фенотипировали с помощью проточной цитометрии для определения экспрессии белка MHC класса II, как описано в примере 4, с использованием антител, нацеленных на HLA-DR, DQ, DP-PE (BioLegend® кат. № 361704), и с изотипическим контролем-PE (BioLegend® кат. № 400234). Образцы ДНК подвергали ПЦР и последующему NGS-анализу, как описано в **Примере 1**. В **Таблице 9** показаны результаты редактирования гена CIITA и отрицательные результаты MHC класса II для клеток, отредактированных с помощью BC22. В **Таблице 10** показаны результаты редактирования гена CIITA и отрицательные результаты MHC класса II для клеток, отредактированных с помощью Cas9.

[00410] **Таблица 9 - Процент редактирования и процент отрицательных клеток MHC-II после редактирования CIITA с помощью BC22**

Направляющая	**% C в T**			**% A в G**			**% инделов**			**% отрицательных по MHC класса II**		
	Среднее	**SD**	**n**	**Среднее**	**SD**	**n**	**Среднее**	**SD**	**n**	**Среднее**	**SD**	**n**
G016030	40,2	14,2	2	3,5	1,1	2	2,4	1,1	2	39,7	5,6	2
G016031	58,8	0,0	1	3,4	3,2	2	0,6	0,8	2	41,5	3,0	2

G016032	1,8	0,6	2	18,2	1,3	2	75,2	0,6	2	45,9	4,2	2
G016033	1,6	0,1	2	30,7	2,2	2	18,0	5,2	2	38,5	1,5	2
G016034	52,8	14,8	2	1,5	0,5	2	2,0	0,3	2	41,8	2,2	2
G016035	50,3	14,5	2	1,6	0,6	2	1,4	0,4	2	40,8	2,5	2
G016036	14,2	4,9	2	2,2	0,3	2	2,4	0,3	2	40,1	2,4	2
G016037	10,1	4,5	2	1,3	0,4	2	0,3	0,1	2	38,2	0,8	2
G016038	71,3	6,5	2	3,2	0,1	2	3,0	0,6	2	45,6	2,6	2
G016039	66,0	5,9	2	5,0	0,1	2	10,5	2,9	2	38,6	0,5	2
G016040	Нет данных			0,0	0,0	1	0,0	0,0	1	38,4	0,7	2
G016041	Нет данных			3,1	4,3	2	3,3	1,2	2	40,4	2,1	2
G016042	21,5	7,9	2	3,2	0,1	2	1,6	0,9	2	44,4	3,7	2
G016043	44,7	11,5	2	2,3	0,1	2	3,2	0,5	2	40,5	1,6	2
G016044	93,4	2,3	2	1,8	0,4	2	4,9	0,7	2	39,9	0,9	2
G016045	7,1	3,0	2	1,2	0,1	2	2,2	0,2	2	39,8	0,7	2
G016046	63,7	11,5	2	2,9	0,1	2	3,3	0,1	2	46,4	1,4	2
G016047	72,7	3,0	2	2,9	0,2	2	4,6	0,9	2	45,4	2,0	2
G016048	6,2	2,4	2	2,4	0,1	2	0,2	0,1	2	38,4	0,5	2
G016049	66,8	9,0	2	5,4	0,1	2	2,8	0,1	2	42,4	2,5	2
G016050	45,4	9,0	2	2,3	0,3	2	3,0	0,6	2	39,1	2,8	2
G016051	86,2	5,9	2	3,7	0,1	2	1,3	0,3	2	39,5	0,6	2
G016052	53,7	13,7	2	4,2	0,9	2	7,4	0,4	2	42,1	1,8	2
G016053	38,6	18,7	2	1,3	0,3	2	3,1	0,8	2	40,4	1,7	2
G016054	42,0	10,7	2	1,9	0,1	2	2,1	0,4	2	42,1	4,2	2
G016055	36,6	13,1	2	3,5	0,9	2	8,2	2,3	2	41,3	1,5	2
G016056	78,0	9,1	2	3,4	0,1	2	2,0	0,1	2	39,8	3,4	2
G016057	73,3	9,1	2	3,4	0,6	2	5,3	0,0	2	39,7	1,3	2
G016058	75,0	9,1	2	1,7	0,1	2	4,2	0,0	2	46,0	2,3	2
G016059	66,5	12,0	2	4,3	0,2	2	4,7	0,7	2	41,0	0,8	2
G016060	55,6	5,2	2	3,5	0,4	2	10,7	1,0	2	44,2	1,6	2
G016061	65,5	9,3	2	2,5	0,4	2	1,2	0,0	2	38,6	2,0	2
G016062	65,8	9,1	2	3,0	0,2	2	4,3	0,3	2	39,8	0,1	2
G016063	10,2	4,2	2	0,9	0,2	2	0,3	0,1	2	39,9	2,5	2
G016064	66,8	12,2	2	3,5	0,0	2	4,4	1,1	2	59,2	2,2	2
G016065	13,5	5,5	2	0,6	0,2	2	1,1	0,4	2	40,4	2,5	2

G016066	0,1	0,0	2	0,7	0,1	2	0,3	0,0	2	35,4	1,5	2
G016067	82,7	6,4	2	2,6	0,6	2	4,6	0,2	2	59,8	1,2	2
G016068	60,1	8,9	2	2,5	0,8	2	1,1	0,1	2	54,0	0,7	2
G016069	55,8	11,6	2	2,6	0,6	2	2,6	1,1	2	34,3	4,0	2
G016070	76,5	9,6	2	3,5	1,0	2	4,4	0,3	2	53,3	1,7	2
G016071	54,3	6,8	2	4,1	0,5	2	1,4	0,6	2	45,8	0,1	2
G016072	82,0	0,0	1	4,1	0,0	1	5,1	0,0	1	25,1	1,1	2
G016073	63,4	11,1	2	3,5	0,5	2	0,9	0,0	2	38,7	1,3	2
G016074	62,7	13,0	2	3,9	0,2	2	4,2	0,7	2	53,3	2,0	2
G016075	41,2	17,2	2	1,0	0,4	2	8,0	1,7	2	48,1	0,7	2
G016076	42,8	14,3	2	0,9	0,1	2	10,2	2,8	2	55,6	2,9	2
G016077	65,1	10,6	2	5,4	0,2	2	2,4	0,1	2	46,0	0,2	2
G016078	44,1	15,1	2	2,0	0,6	2	6,6	2,0	2	41,6	0,1	2
G016079	79,8	4,9	2	5,6	0,5	2	4,6	0,9	2	53,4	2,8	2
G016080	39,0	12,2	2	4,3	0,6	2	13,1	3,1	2	49,5	3,1	2
G016081	9,6	4,9	2	0,5	0,3	2	2,5	0,8	2	39,0	0,3	2
G016082	20,3	8,6	2	2,0	0,3	2	7,0	3,3	2	40,1	4,1	2
G016083	74,5	9,8	2	3,6	0,1	2	8,0	0,6	2	48,6	2,3	2
G016084	46,0	8,5	2	3,9	0,0	2	23,5	3,2	2	54,5	0,7	2
G016085	35,6	6,7	2	1,4	0,1	2	1,6	0,1	2	41,9	3,0	2
G016086	75,0	10,3	2	3,9	0,4	2	3,5	0,2	2	63,1	1,3	2
G016087	45,3	9,9	2	1,2	0,1	2	3,4	0,5	2	40,3	3,7	2
G016088	67,8	10,5	2	5,6	1,4	2	6,9	1,4	2	44,1	3,3	2
G016089	64,4	10,5	2	4,5	0,1	2	1,5	0,3	2	38,3	1,8	2
G016090	67,1	7,1	2	1,7	0,1	2	16,9	2,2	2	61,3	2,3	2
G016091	47,4	12,0	2	2,1	0,9	2	2,9	2,2	2	54,0	3,9	2
G016092	71,4	11,5	2	3,3	0,1	2	6,5	0,5	2	54,9	0,9	2
G016093	76,6	8,3	2	3,3	0,2	2	3,7	0,1	2	52,2	2,5	2
G016094	75,5	7,5	2	3,6	0,4	2	1,7	0,2	2	44,0	2,5	2
G016095	76,1	7,2	2	7,6	0,4	2	2,8	0,4	2	44,1	0,4	2
G016096	77,6	8,5	2	2,1	0,2	2	4,6	0,4	2	41,2	3,0	2
G016097	44,7	15,0	2	2,2	0,1	2	0,7	0,1	2	38,6	3,2	2
G016098	28,9	8,8	2	1,6	0,4	2	1,6	0,2	2	40,1	4,7	2
G016099	68,8	11,9	2	2,2	0,1	2	3,9	0,7	2	44,8	1,0	2

G016100	85,4	6,9	2	2,4	0,6	2	3,3	0,4	2	43,5	1,9	2
G016101	4,8	1,1	2	0,8	0,1	2	0,2	0,0	2	38,0	3,3	2
G016102	57,5	14,4	2	1,9	0,1	2	2,3	0,4	2	42,6	3,3	2
G016103	69,4	12,8	2	2,4	0,0	2	5,6	0,5	2	39,1	2,7	2
G016104	66,5	12,2	2	1,6	0,7	2	11,1	0,4	2	49,0	3,3	2
G016105	58,4	14,3	2	4,4	0,6	2	8,3	0,7	2	38,4	3,0	2
G016106	74,8	5,7	2	3,3	0,3	2	7,3	0,3	2	51,8	0,1	2
G016107	45,2	12,2	2	5,8	1,1	2	5,4	0,8	2	39,6	1,0	2
G016108	15,3	3,5	2	1,2	0,1	2	1,2	0,4	2	41,5	0,1	2
G016109	77,5	3,7	2	4,5	0,4	2	3,4	0,6	2	48,3	2,5	2
G016110	43,1	15,3	2	1,7	0,2	2	6,9	1,6	2	45,4	0,6	2
G016111	89,2	1,3	2	4,2	0,1	2	5,6	0,8	2	40,6	4,4	2
G016112	68,8	13,2	2	3,8	0,4	2	1,4	0,1	2	43,4	2,7	2
G016113	65,2	9,8	2	3,6	0,2	2	6,9	1,1	2	58,3	2,5	2
G016114	75,5	11,5	2	2,7	0,1	2	5,1	0,6	2	38,9	4,0	2
G016115	72,1	8,6	2	1,2	0,1	2	7,9	0,3	2	60,2	0,9	2
G016116	36,3	7,5	2	2,3	0,8	2	3,0	0,4	2	41,1	0,4	2
G016117	75,4	7,7	2	3,5	0,4	2	5,9	0,4	2	37,1	2,8	2

[00411] **Таблица 10 - Процент редактирования и процент отрицательных клеток MHC-II после редактирования CIITA с помощью Cas9**

	% C в T			**% A в G**			**% инделов**			**% отрицательных по MHC класса II**		
Направляющая	**Среднее**	**SD**	**n**	**Среднее**	**SD**	**N**	**Среднее**	**SD**	**n**	**Среднее**	**SD**	**n**
G016030	0,0	0,0	2	0,4	0,0	2	30,1	8,3	2	42,7	0,4	2
G016031	0,0	0,0	1	0,1	0,0	1	79,5	0,0	1	45,9	1,0	2
G016032	0,1	0,1	2	14,8	2,6	2	77,7	4,8	2	43,6	0,1	2
G016033	0,1	0,1	2	16,1	2,4	2	61,5	5,3	2	44,1	1,8	2
G016034	0,0	0,0	2	0,1	0,0	2	49,7	6,2	2	46,1	2,7	2
G016035	0,0	0,0	2	0,1	0,0	2	44,7	6,4	2	46,2	0,6	2
G016036	0,0	0,0	2	1,8	0,3	2	5,6	0,1	2	38,3	1,8	2
G016037	0,1	0,1	2	1,2	0,1	2	3,4	0,4	2	35,9	1,1	2

G016038	0,0	0,0	2	0,6	0,1	2	88,3	3,5	2	65,7	2,9	2
G016039	0,0	0,0	2	0,1	0,0	2	91,9	2,6	2	62,9	2,5	2
G016040	Нет данных									63,2	0,6	2
G016041	Нет данных									62,3	0,6	2
G016042	0,0	0,0	2	1,5	0,3	2	40,6	10,8	2	43,9	0,6	2
G016043	0,0	0,0	2	1,3	0,1	2	26,7	4,9	2	42,9	0,4	2
G016044	Нет данных			0,2	0,0	1	74,4	0,0	1	54,9	0,8	2
G016045	0,1	0,1	2	0,8	0,0	2	13,9	4,3	2	40,6	0,8	2
G016046	0,0	0,0	2	0,2	0,1	2	92,8	2,4	2	62,5	0,6	2
G016047	0,1	0,1	2	0,2	0,0	2	80,0	2,0	2	59,8	0,9	2
G016048	0,0	0,0	2	2,1	0,0	2	9,3	2,5	2	41,0	0,8	2
G016049	0,0	0,0	2	0,1	0,0	2	85,8	3,0	2	56,9	0,3	2
G016050	0,1	0,1	2	0,6	0,1	2	38,4	1,6	2	45,0	0,4	2
G016051	0,0	0,0	2	0,4	0,0	2	82,6	3,6	2	58,8	1,4	2
G016052	0,1	0,1	2	0,6	0,1	2	69,8	7,0	2	53,8	0,4	2
G016053	Нет данных									43,4	1,2	2
G016054	0,0	0,0	2	1,1	0,1	2	28,1	7,0	2	44,9	3,2	2
G016055	0,0	0,0	2	0,6	0,1	2	37,1	7,7	2	47,5	0,4	2
G016056	0,0	0,0	2	0,1	0,0	2	89,5	5,3	2	63,8	0,6	2
G016057	0,0	0,0	2	0,1	0,0	2	84,7	4,0	2	61,6	3,1	2
G016058	0,0	0,0	2	0,2	0,1	2	82,3	5,9	2	60,4	2,2	2
G016059	0,0	0,0	2	0,1	0,0	2	75,1	3,7	2	56,6	1,6	2
G016060	0,0	0,0	2	0,2	0,0	2	84,3	3,8	2	61,5	1,8	2
G016061	0,0	0,0	2	0,1	0,0	2	55,2	2,9	2	47,4	0,6	2
G016062	0,0	0,0	2	0,5	0,1	2	71,1	5,9	2	46,4	0,7	2
G016063	0,0	0,0	2	0,6	0,0	2	5,1	1,4	2	36,1	1,4	2
G016064	0,0	0,0	2	1,3	0,1	2	42,7	5,7	2	49,1	0,7	2
G016065	0,0	0,0	2	0,1	0,0	2	11,0	2,0	2	40,0	0,9	2
G016066	0,0	0,0	2	0,6	0,0	2	0,4	0,1	2	36,8	0,6	2
G016067	0,1	0,0	2	0,1	0,0	2	85,4	3,3	2	59,7	3,3	2
G016068	0,0	0,0	2	0,1	0,0	2	59,2	6,9	2	54,0	0,2	2
G016069	0,0	0,0	2	0,4	0,0	2	39,5	3,7	2	40,7	0,0	2
G016070	0,1	0,1	2	0,1	0,1	2	92,3	2,3	2	66,4	3,1	2

G016071	0,0	0,0	2	0,2	0,0	2	73,1	2,2	2	55,6	3,0	2
G016072	0,0	0,0	2	0,1	0,1	2	91,1	1,4	2	51,6	1,1	2
G016073	0,0	0,0	2	1,5	0,1	2	38,3	4,2	2	43,5	0,8	2
G016074	0,2	0,1	2	0,6	0,0	2	72,4	7,5	2	56,1	1,4	2
G016075	0,1	0,1	2	0,3	0,1	2	72,9	10,3	2	57,8	4,4	2
G016076	0,0	0,0	2	0,3	0,1	2	66,7	13,4	2	58,4	4,6	2
G016077	0,0	0,0	2	0,5	0,1	2	80,0	5,2	2	62,5	1,5	2
G016078	0,1	0,1	2	0,3	0,2	2	59,3	10,5	2	51,6	4,5	2
G016079	0,0	0,0	2	0,7	0,1	2	81,9	4,0	2	58,4	1,0	2
G016080	0,0	0,0	2	0,5	0,1	2	71,8	6,2	2	44,9	1,4	2
G016081	0,0	0,0	2	0,4	0,0	2	8,1	1,3	2	39,1	0,7	2
G016082	0,1	0,1	2	2,1	0,0	2	10,0	2,5	2	39,0	0,8	2
G016083	0,1	0,1	2	0,2	0,1	2	92,2	1,5	2	63,6	0,7	2
G016084	0,0	0,0	2	0,4	0,0	2	70,7	6,4	2	56,1	2,6	2
G016085	0,0	0,0	2	0,3	0,1	2	17,5	0,7	2	42,3	0,4	2
G016086	0,1	0,1	2	0,2	0,1	2	85,8	6,1	2	62,2	3,0	2
G016087	0,0	0,0	2	0,2	0,0	2	89,5	2,1	2	56,1	0,1	2
G016088	0,8	0,0	2	0,3	0,1	2	76,8	4,6	2	58,1	0,5	2
G016089	0,1	0,1	2	0,3	0,1	2	73,3	6,4	2	54,2	0,0	2
G016090	0,2	0,0	2	0,3	0,0	2	88,3	5,1	2	61,2	2,3	2
G016091	0,0	0,0	1	0,7	0,0	1	42,0	0,0	1	49,5	3,8	2
G016092	0,1	0,1	2	0,5	0,1	2	60,9	10,0	2	52,0	2,9	2
G016093	0,0	0,0	2	0,5	0,1	2	68,8	8,1	2	50,6	2,5	2
G016094	0,1	0,1	2	0,1	0,0	2	71,3	6,5	2	50,5	3,3	2
G016095	0,0	0,0	2	0,6	0,1	2	70,5	5,4	2	51,6	5,0	2
G016096	0,2	0,1	2	0,1	0,0	2	94,9	2,0	2	51,2	0,1	2
G016097	0,1	0,1	2	0,3	0,0	2	39,7	12,4	2	50,9	4,5	2
G016098	0,1	0,1	2	0,2	0,0	2	23,4	7,5	2	47,2	0,5	2
G016099	0,1	0,0	2	0,2	0,0	2	84,7	5,8	2	63,2	2,5	2

G016100	0,0	0,0	2	0,3	0,1	2	79,8	7,1	2	60,3	0,6	2
G016101	0,1	0,1	2	0,6	0,1	2	2,3	0,8	2	38,8	1,5	2
G016102	0,0	0,0	2	0,4	0,1	2	75,7	8,9	2	59,9	7,1	2
G016103	0,2	0,1	2	0,6	0,1	2	76,8	4,7	2	46,9	3,4	2
G016104	1,4	0,0	1	1,1	0,0	1	66,8	0,0	1	56,1	3,1	2
G016105	0,1	0,1	2	0,7	0,3	2	90,7	5,1	2	58,0	3,0	2
G016106	0,0	0,0	2	0,2	0,0	2	95,1	2,1	2	62,2	3,0	2
G016107	0,1	0,1	2	0,2	0,0	2	84,9	2,6	2	59,5	1,1	2
G016108	0,0	0,0	2	0,6	0,1	2	19,1	4,8	2	43,3	0,8	2
G016109	0,0	0,0	2	0,1	0,0	2	86,5	3,3	2	62,9	3,5	2
G016110	0,0	0,0	2	0,6	0,1	2	34,9	10,0	2	48,0	4,2	2
G016111	65,6*	3,7	2	1,4	0,1	2	32,9	3,7	2	44,5	1,3	2
G016112	0,0	0,0	2	0,8	0,1	2	60,7	6,7	2	54,1	5,3	2
G016113	1,1	0,4	2	0,2	0,0	2	84,2	6,7	2	60,5	5,2	2
G016114	0,1	0,1	2	0,4	0,0	2	87,6	3,5	2	50,2	2,5	2
G016115	0,0	0,0	2	0,3	0,1	2	69,3	7,4	2	52,8	4,8	2
G016116	0,0	0,0	2	0,4	0,0	2	16,6	5,0	2	38,7	0,4	2
G016117	0,0	0,0	2	0,4	0,1	2	85,6	4,9	2	49,0	3,0	2

* Существует природный однонуклеотидный полиморфизм C/T для последовательности-мишени G016111.

Пример 6. Доза-ответ и мультиплексное редактирование

[00412] Три направляющих из **Таблицы 9**, G016086, G016092 и G016067, были дополнительно охарактеризованы по эффективности редактирования с увеличением количества направляющей и в сочетании с направляющими, предназначенными для TRAC (G013009, G016016 или G016017) и B2M (G015991, G015995 или G015996). Как правило, если в контексте не указано иное, направляющие РНК, применяемые в Примерах, обозначенные как «GXXXXXX», относятся к 100-нуклеотидному формату модифицированной онРНК, если в контексте не указано иное, например, как продемонстрированные в приведенных в настоящем документе Таблицах.

[00413] Подготовку клеток, активацию и электропорацию проводили, как описано в **примере 5**, со следующими отклонениями. Редактирование выполняли с использованием двух видов мРНК, кодирующих BC22 (SEQ ID NO: 806) и UGI (SEQ ID NO: 807) соответственно. Редактирование оценивали при множественных концентрациях онРНК, как указано в **Таблице 11** и **Таблице 12**. Когда в одной реакции использовали несколько направляющих, каждая направляющая представляла одну четвертую от общей концентрации направляющих.

[00414] На 10-й день после редактирования Т-клетки фенотипировали с помощью проточной цитометрии для определения экспрессии белка MHC класса II, как описано в Примере 6. Кроме того, обнаружение B2M проводили с использованием антител B2M-FITC (BioLegend, кат. 316304) и экспрессию CD3 анализировали, используя антитело CD3-BV605 (BioLegend, кат. 317322). Образцы ДНК подвергали ПЦР и последующему NGS-анализу, как описано в **Примере 1**. В **таблице 11** представлены результаты проточной цитометрии на отсутствие MHC класса II и редактирования NGS для клеток, отредактированных с помощью BC22, и отдельных направляющих, нацеленных на CIITA, на Фиг. 4A показан процент преобразования C в T, а на Фиг.4B показан процент отрицательных по MHC класса II. В **таблице 12** показаны отрицательные результаты MHC класса II для клеток, отредактированных одновременно с помощью направляющих CIITA, B2M, TRAC и TRBC.

[00415] **Таблица 11 - Процент отрицательных клеток MHC-II и результаты NGS после редактирования CIITA (n=2)**

Концентрация направляющей		**2 мкМ**		**1 мкМ**		**0,5 мкМ**		**0,25 мкМ**	
Анализ	**Направляющая**	**Среднее**	**SD**	**Среднее**	**SD**	**Среднее**	**SD**	**Среднее**	**SD**
отр. по MHC-II	G016086	80,2	12,0	72,2	19,7	60,5	14,3	49,7	16,1
	G016092	64,5	11,4	59,3	11,8	49,0	5,7	42,6	15,1
	G016067	77,3	4,4	76,8	2,1	64,5	6,3		
C-в-T	G016086	75,4	12,7	66,1	25,0	53,9	20,1	38,3	28,3
	G016092	71,5	18,5	62,5	25,5	45,2	13,0	36,0	28,1
	G016067	83,1	6,8	82,9	5,7	66,9	8,8	50,1	28,1
C-в-A/G	G016086	1,8	0,1	1,6	0,1	1,7	0,1	1,1	0,6
	G016092	1,6	0,1	1,3	0,2	1,2	0,0	1,2	0,5
	G016067	1,0	0,3	1,2	0,1	1,5	0,5	0,9	0,5
Индел	G016086	2,5	1,4	1,4	0,5	1,5	0,3	1,2	0,5
	G016092	2,9	0,3	3,0	0,6	3,1	0,5	2,5	1,7
	G016067	3,3	0,1	2,4	0,0	3,4	1,4	2,1	1,2

[00416] **Таблица 12- Процент антиген-негативных клеток после редактирования CIITA, TRAC, TRBC и B2M**

	Концентрация на направляющую:	**0,5 мкМ**		**0,25 мкМ**		**0,125 мкМ**	
Анализ	**Направляющая**	**Среднее**	**SD**	**Среднее**	**SD**	**Среднее**	**SD**
Трижды	G015995 G016086	62,1	9,3	51,9	9,4	26,1	13,6

отрицательный	G016017						
	G015991 G016092 G016016	43,8	15,6	20,2	7,4	8,2	7,6
	G015996 G016067 G013009	35,3	17,7	15,4	12,3	6,8	7,3
отр. по MHC класса II	G015995 G016086 G016017	67,0	8,0	57,6	7,8	38,6	5,4
	G015991 G016092 G016016	57,2	8,2	45,2	3,2	36,8	5,3
	G015996 G016067 G013009	53,1	7,9	69,1	43,1	41,3	7,1
CD3-отриц.	G015995 G016086 G016017	92,5	2,3	90,5	3,2	77,3	15,1
	G015991 G016092 G016016	88,1	6,2	87,6	3,2	74,2	14,0
	G015996 G016067 G013009	92,8	2,0	89,5	4,8	79,3	14,4
B2M-отриц.	G015995 G016086 G016017	94,9	2,5	90,0	6,4	63,2	28,0
	G015991 G016092 G016016	73,4	19,2	29,1	13,1	14,3	15,2
	G015996 G016067 G013009	60,8	25,7	29,1	21,4	14,3	15,0

Пример 7. Сравнение онРНК в Т-клетках

[00417] Т-клетки редактировали в локусе CIITA с Cas9, чтобы оценить влияние типа редактирования на антигены MHC класса II.

7.1 Подготовка Т-клеток

[00418] Аферез здоровых доноров был получен коммерчески (Hemacare), клетки были промыты и ресуспендированы в буфере PBS/ЭДТА CliniMACS® (Miltenyi Biotec, кат. № 130-070-525) на устройстве LOVO. Т-клетки выделяли с помощью положительной селекции с использованием магнитных гранул с CD4 и CD8 (Miltenyi Biotec кат. № 130-030-401/130-030-801) с использованием одноразовых наборов CliniMACS® Plus и CliniMACS® LS. Аликвоты Т-клеток распределяли по флаконам и криоконсервировали в составе Cryostor® CS10 в соотношении 1:1 (StemCell Technologies кат. № 07930) и Plasmalyte A (Baxter кат. № 2B2522X) для дальнейшего использования. После размораживания Т-клетки высевали с плотностью 1,0×10^6 клеток/мл в основную среду

для Т-клеток, состоящую из среды для гемопоэтических клеток без сыворотки X-VIVO 15™ (Lonza Bioscience), содержащей 5% (об./об.) фетальной бычьей сыворотки, 50 мкМ 2-меркаптоэтанола, 10 мМ N-ацетил-L-(+)-цистеина, 10 ЕД/мл пенициллин-стрептомицина, в дополнение к 1X цитокинов (200 ЕД/мл рекомбинантного интерлейкина-2 человека, 5 мкг/мл рекомбинантного интерлейкина-7 человека и 5 мкг/мл рекомбинантного интерлейкина-15 человека). Т-клетки активировали с помощью TransAct™ (разведение 1:100, Miltenyi Biotec). Клетки размножали в основной среде для Т-клеток, содержащей TransAct™, в течение 72 часов перед электропорацией.

7.2 Редактирование Т-клеток с помощью электропорации РНК

[00419] Раствор, содержащий мРНК, кодирующую белок Cas9 (SEQ ID NO: 802) и=мРНК, кодирующую UGI (SEQ ID NO: 807) готовили на стерильной воде. Направляющие РНК денатурировали в течение 2 минут при 95°C перед охлаждением на льду. Через семьдесят два часа после активации Т-клетки собирали и ресуспендировали в концентрации 12,5 × 10^6 Т-клеток/мл в буфере для электропорации P3 (Lonza). Для каждой лунки, предназначенной для электропорации, 1×10^5 Т-клеток смешивали с 200 нг редактора мРНК, 200 нг мРНК UGI и 40 пмоль онРНК, как описано в **таблице 13**, в конечном объеме 20 мкл буфера для электропорации P3. Эту смесь в двух повторностях переносили на 96-луночный планшет Nucleofector™ и подвергали электропорации, используя импульсный код производителя. Электропорированные Т-клетки немедленно помещали в свободную от цитокинов среду на основе Optmizer. Клетки инкубировали при 37°C в течение 4 дней в среде на основе Optmizer с цитокинами. Через 96 часов некоторые клетки собирали для NGS-анализа, а оставшиеся Т-клетки разводили 1:3 в свежей среде на основе OpTmizer с цитокинами. Затем электропорированные Т-клетки культивировали в течение 11 дополнительных дней и собирали для анализа проточной цитометрией.

7.3 Проточная цитометрия

[00420] На 11-й день после редактирования Т-клетки фенотипировали с помощью проточной цитометрии для определения экспрессии белка MHC класса II, как описано в примере 4, с использованием антител, нацеленных на HLA-DR, DQ, DP-FITC (BioLegend® кат. № 361706). В **таблице 13** показана экспрессия белка MHC класса II после электропорации с мРНК UGI в сочетании с Cas9.

[00421] **Таблица 13. Процент клеток, отрицательных по MHC-II, после редактирования CIITA**

Направляющая	% отр. по MHC класса II	SD
G013675	93,1	4,2
G013676	79,3	6,4
G015964	49,6	27,4
G016030	62,5	2,5
G016031	36,5	0,5
G016032	94,3	8,1

G016033	69,7	2,1
G016034	79,0	1,7
G016035	86,3	3,0
G016037	33,2	4,2
G016038	93,1	7,1
G016039	89,2	0,4
G016040	80,1	1,6
G016041	80,1	9,3
G016042	62,2	4,2
G016043	68,7	6,0
G016044	88,3	11,1
G016045	69,5	5,1
G016046	88,2	12,9
G016047	85,2	8,1
G016048	46,5	0,1
G016049	90,8	4,6
G016050	84,3	0,4
G016051	87,4	9,3
G016052	67,7	0,4
G016053	57,6	5,2
G016054	75,8	4,2
G016055	80,0	1,2
G016056	92,8	2,1
G016057	88,3	2,2
G016058	87,1	11,6
G016059	72,1	2,4
G016060	93,1	2,0
G016061	70,6	2,0
G016062	58,9	25,1
G016063	53,5	8,2
G016064	82,8	1,6
G016065	61,3	1,3
G016066	52,1	11,8
G016067*	72,4	0,2

G016068	84,8	3,7
G016069	54,0	5,7
G016070	96,0	1,1
G016071	85,4	15,6
G016072	77,9	4,7
G016073	78,3	3,0
G016074	86,4	12,9
G016075	78,7	2,1
G016076	89,6	3,1
G016077	81,1	7,7
G016078	89,6	10,3
G016079	97,1	0,2
G016080	59,0	7,8
G016081	64,7	9,1
G016082	58,4	5,5
G016083	34,7	4,2
G016084	92,9	6,8
G016085	66,8	0,6
G016086*	51,2	1,8
G016087	77,4	2,2
G016088	88,1	10,5
G016089	91,8	2,9
G016090	92,1	2,6
G016091	95,9	0,6
G016092*	81,2	9,3
G016093	85,7	2,9
G016094	87,6	6,2
G016095	83,3	12,7
G016096	48,5	0,4
G016097	74,1	7,7
G016098	79,7	1,9
G016099	86,2	17,2
G016100	88,6	0,3
G016101	38,5	3,3

G016102	93,4	0,0
G016103	60,8	9,2
G016104	91,8	5,3
G016105	71,2	3,0
G016106	78,2	12,1
G016107	62,6	5,8
G016108	64,8	4,6
G016109	93,1	1,0
G016110	90,3	1,9
G016111	87,0	15,4
G016112	51,3	32,7
G016113	98,0	1,1
G016114	44,9	9,7
G016115	80,2	11,4
G016116	80,1	12,9
G016117	58,8	16,1
G018081	94,5	0,8
G018082	94,9	1,7

* Концентрация может иметь технические отклонения

Пример 8 - Вставка CIITA

8.1 Подготовка Т-клеток

[00422] Аферез здоровых доноров был получен коммерчески (Hemacare), клетки были промыты и ресуспендированы в 2% буфере PBS/ЭДТА. Т-клетки выделяли на MultiMACS (Miltenyi Biotec кат. № 130-098-637) путем положительной селекции с использованием набора StraightFrom® Leukopak® CD4/CD8 MicroBead Kit (Miltenyi Biotec кат. № 130-122-352). Аликвоты Т-клеток распределяли по флаконам и криоконсервировали в составе Cryostor CS10 в соотношении Cryostor® (StemCell Technologies кат. № 07930).

[00423] После размораживания Т-клетки высевали с плотностью 1,0×10^6 клеток/мл в основную среду для Т-клеток, состоящую из среды для гемопоэтических клеток без сыворотки X-VIVO 15™ (Lonza Bioscience), содержащей 5% (об./об.) фетальной бычьей сыворотки, 55 мкМ 2-меркаптоэтанола, 10 мМ N-ацетил-L-(+)-цистеина, 10 ЕД/мл пенициллин-стрептомицина, в дополнение к 1X цитокинов (200 ЕД/мл рекомбинантного интерлейкина-2 человека, 5 мкг/мл рекомбинантного интерлейкина-7 человека и 5 мкг/мл рекомбинантного интерлейкина-15 человека). На следующий день Т-клетки активировали с помощью TransAct™ (разведение 1:100, Miltenyi Biotec). Клетки размножали в основной среде для Т-клеток, содержащей TransAct™, в течение 48 часов

перед электропорацией.

8.2 Редактирование Т-клеток с помощью рибонуклеопротеина и AAV

[00424] Отобранные онРНК инкубировали с рекомбинантным белком Sp. Cas9-NLS (SEQ ID NO: 800) с образованием рибонуклеопротеиновых (RNP) комплексов. Нацеленные на CIITA онРНК, денатурировали в течение 2 минут при 95°C перед охлаждением при комнатной температуре. Готовили смесь RNP из 40 мкМ онРНК и 20 мкМ белка Cas9-NLS и инкубировали при 25 °C в течение 10 минут. 2,5 мкл смеси RNP объединяли с 1 000 000 CD3+ Т-клеток в 20 мкл буфера для электропорации P3 (Lonza). 25 мкл смеси RNP/клеток переносили в соответствующие лунки 96-луночного планшета для электропорации Lonza Shuttle. Клетки подвергали электропорации в двух экземплярах с кодом импульса производителя. Базовую среду для Т-клеток добавляли к клеткам сразу после нуклеофекции, и клетки переносили в 24-луночный планшет, содержащий среду для Т-клеток, содержащую цитокины. Конструкции AAV были сконструированы, кодируя репортерный ген mCherry, фланкированный гомологическими ответвлениями непосредственно с 5’ и 3’ от каждого участка разреза направляющей (SEQ ID NO: 1001-1003). В соответствующие лунки добавляли AAV при MOI 3×10^5. Клетки переносили в 24-луночный планшет Grex (Wilson Wolf, кат. 80192) на следующий день и размножали в течение 10 дней со сменой среды в соответствии с протоколом производителя.

8.3 Проточная цитометрия

[00425] На 10-й день после редактирования Т-клетки фенотипировали с помощью проточной цитометрии для определения экспрессии белка MHC класса II и экспрессии репортера mCherry. Вкратце, Т-клетки инкубировали в коктейлях антител, состоящих из CD4-BV605 (BioLegend® кат. № 317438), CD8-AF700 (BioLegend® кат. № 344724) и HLA-DR, DQ, DP-FITC (BioLegend® кат. № 361706). Затем клетки промывали, обрабатывали с помощью проточного цитометра Cytoflex (Beckman Coulter) и анализировали с применением программного пакета FlowJo. Т-клетки гейтировали по размеру, форме с последующим гейтированием CD4 и CD8. Затем вставку количественно оценивали с использованием экспрессии mCherry, как показано в **таблице 14** и на **фиг. 5A**. Экспрессию MHC класса II также анализировали для количественной оценки частоты редактирования, как показано в **таблице 15** и на **фиг. 5B**.

[00426] **Таблица 14. Средний процент положительных на mCherry клеток после редактирования.**

Вставка	**Направляющая**	**CD4**		**CD8**		**N**
		% mCherry+	**SD**	**% mCherry+**	**SD**	
с AAV	G013676	12,9	0,8	17,2	3,2	2
	G013675	24,9	0,1	27,8	0,7	2
	G015535	13,7	0,1	17,4	1,8	2
без AAV	G013676	0,0	н/д	0,0	н/д	1

Вставка	Направляющая	CD4		CD8		N
		% mCherry+	SD	% mCherry+	SD	
	G013675	0,0	н/д	0,0	н/д	1
	G015535	0,1	н/д	0,0	н/д	1

[00427] **Таблица 15 - Средний процент клеток, отрицательных по MHC класса II после редактирования**

Вставка	Направляющая	% отр. по MHC класса II	SD	n
с AAV	G013676	86,9	1,1	2
	G013675	89,6	0,2	2
	G015535	57,1	0,7	2
без AAV	G013676	87,5	н/д	1
	G013675	86,3	н/д	1
	G015535	51,5	н/д	1
необработанные		34	н/д	1

Пример 9 - Титрование LNP в Т-клетках с фиксированным соотношением BC22n:UGI

[00428] Используя доставку LNP к активированным Т-клеткам человека, эффективность многоцелевого редактирования оценивали либо с помощью Cas9, либо с BC22n.

9.1. Подготовка Т-клеток

[00429] Аферез здоровых доноров был получен коммерчески (Hemacare), клетки были промыты и ресуспендированы в буфере PBS/ЭДТА CliniMACS® (Miltenyi Biotec, кат. № 130-070-525) на устройстве LOVO. Т-клетки выделяли с помощью положительной селекции с использованием магнитных гранул с CD4 и CD8 (Miltenyi Biotec кат. № 130-030-401/130-030-801) с использованием одноразовых наборов CliniMACS® Plus и CliniMACS® LS. Аликвоты Т-клеток распределяли по флаконам и криоконсервировали в составе Cryostor® CS10 в соотношении 1:1 (StemCell Technologies кат. № 07930) и Plasmalyte A (Baxter кат. № 2B2522X) для дальнейшего использования. После размораживания Т-клетки высевали с плотностью 1,0×10^6 клеток/мл в основную среду для Т-клеток, состоящую из среды для гемопоэтических клеток без сыворотки X-VIVO 15™ (Lonza Bioscience), содержащей 5% (об./об.) фетальной бычьей сыворотки, 50 мкМ 2-меркаптоэтанола, 10 мМ N-ацетил-L-(+)-цистеина, 10 ЕД/мл пенициллин-стрептомицина, в дополнение к 1X цитокинов (200 ЕД/мл рекомбинантного интерлейкина-2 человека, 5 мкг/мл рекомбинантного интерлейкина-7 человека и 5 мкг/мл рекомбинантного интерлейкина-15 человека). Т-клетки активировали с помощью TransAct™ (разведение

1:100, Miltenyi Biotec). Клетки размножали в основной среде для Т-клеток в течение 72 часов перед трансфекцией LNP.

9.2 Редактирование Т-клеток

[00430] Каждый вид РНК, т.е. мРНК UGI, онРНК или мРНК редактора, готовили отдельно в LNP, как описано в **Примере 1**. Редактор мРНК кодируют либо BC22n (SEQ ID NO: 805) или Cas9 (SEQ ID NO: 803). Использовали онРНК, нацеленную на CIITA (G016086) (SEQ ID NO: 395). мРНК UGI (SEQ ID NO: 807) доставляется как в Cas9, так и в BC22n подгруппы эксперимента для нормализации количества липидов. Предыдущие эксперименты установили, что мРНК UGI не влияет на общее редактирование или профиль редактирования при использовании с мРНК Cas9. Композиции LNP смешивали с фиксированной общей мРНК в массовом соотношении 6:3:2 для мРНК редактора, направляющей РНК и мРНК UGI соответственно, как описано в **Таблице 16**. Смеси LNP инкубировали в течение 5 минут при 37°C в основной среде для Т-клеток с заменой 6% сыворотки яванского макака (Bioreclamation IVT, кат. CYN220760) на фетальную бычью сыворотку.

[00431] Через семьдесят два часа после активации Т-клетки промывали и суспендировали в основной среде для Т-клеток. В каждую лунку добавляли предварительно инкубированную смесь LNP в количестве 1×10^5 Т-клеток/лунка. Т-клетки инкубировали при 37°C с 5% CO_2 в течение всего эксперимента. Среду для Т-клеток меняли через 6 дней и 8 дней после активации, а на десятый день после активации клетки собирали для анализа с помощью NGS и проточной цитометрии. NGS-анализ проводили, как описано в **Примере 1**. В **таблице 16** и **фиг. 6A** описано редактирование Т-клеток. Полное редактирование и редактирование C в T продемонстрировали прямую дозозависимую связь с увеличением количества мРНК BC22n, мРНК UGI и направляющей для всех исследованных направляющих. Индел и преобразование C в A или G находится в обратной зависимости от дозы, где более низкие дозы приводили к более высокому проценту этих мутаций. В образцах, отредактированных с помощью Cas9, общее редактирование и активность инделирования увеличиваются с увеличением общей дозы РНК.

[00432] **Таблица 16 - Редактирование в процентах от общего числа считываний доставка одной направляющей (n=2)**

Направляющая	**Редактор**	**Общая РНК (нг)**	**% C-в-T**		**% C-в-A/G**		**% инделов**	
			среднее	**SD**	**среднее**	**SD**	**среднее**	**SD**
G016086	BC22n	0,0	0,2	0,0	1,0	0,1	0,1	0,0
		8,6	23,5	1,8	3,2	0,1	3,7	0,1
		17,2	40,9	1,1	4,4	0,7	4,6	1,0
		34,4	58,0	0,5	4,6	0,3	3,8	0,6
		68,8	73,5	0,7	3,7	0,0	2,8	0,5

Направляющая	Редактор	Общая РНК (нг)	% С-в-Т		% С-в-A/G		% инделов	
			среднее	SD	среднее	SD	среднее	SD
		137,5	83,8	1,1	3,7	0,5	2,0	0,7
		275,0	90,1	2,4	3,1	0,1	1,9	0,8
		550,0	93,4	0,9	3,0	0,2	1,2	0,3
	Cas9	0,0	0,2	0,0	1,0	0,1	0,1	0,0
		8,6	0,2	0,0	1,1	0,2	7,4	0,7
		17,2	0,2	0,0	1,1	0,3	17,7	1,0
		34,4	0,2	0,0	0,8	0,1	32,1	0,1
		68,8	0,2	0,0	0,7	0,2	51,5	0,8
		137,5	0,2	0,0	0,4	0,0	69,3	0,1
		275,0	0,3	0,1	0,3	0,1	84,2	0,1
		550,0	0,3	0,0	0,1	0,1	90,0	0,7

[00433] На 10-й день после активации Т-клетки фенотипировали с помощью проточной цитометрии для измерения потери белков клеточной поверхности с использованием антител, нацеленных на HLA DR DQ DP-PE (BioLegend, кат 361704) и DAPI (BioLegend, кат 422801), как описано в **Примере 5**. Подмножество неотредактированных клеток инкубировали с изотипическим контролем-PE (BioLegend®, кат. №. 400234).

[00434] В **Таблице 17** и на **Фиг. 6B** представлены результаты фенотипирования в виде процента клеток, отрицательных в отношении связывания антител. Процент антиген-негативных клеток увеличивался дозозависимым образом с увеличением общей РНК как для образцов BC22n, так и для образцов Cas9. Клетки, отредактированные с помощью BC22n, показали сравнимый или более высокий нокаут белка по сравнению с клетками, отредактированными с помощью Cas9, для всех исследованных направляющих.

[00435] **Таблица 17 - Данные проточной цитометрии - процент клеток, отрицательных по MHC II класса (n=2)**

Направляющая(ие)	Фенотип	Общая РНК (нг)	BC22n		Cas9	
			Средний %	SD	Средний %	SD
G016086 CIITA	HLA DR DP DQ-отриц.	550,0	96,0	0,1	90,9	0,7
		275,0	93,7	0,1	87,4	0,3
		137,5	88,4	0,5	76,3	0,6
		68,8	80,0	0,7	66,1	1,8
		34,4	69,2	1,5	53,4	1,1

		17,2	56,4	0,4	41,9	0,8
		8,6	45,2	2,9	37,3	0,1
		0,0	30,1	0,9	36,8	0,4

Пример 10. Нецелевой анализ

10.1 Биохимический нецелевой анализ

[00436] Биохимический метод (см., например, Cameron et al., Nature Methods. 6, 600-606; 2017) был использован для определения потенциальных нецелевых геномных сайтов, расщепленных Cas9, с использованием специальных направляющих, нацеленных на CIITA. В этом эксперименте две онРНК, нацеленные на CIITA человека, подвергали скринингу с использованием геномной ДНК, очищенной из клеточной линии лимфобластов NA24385 (Coriell Institute), наряду с тремя контрольными направляющими с известными нецелевыми профилями. Количество потенциальных нецелевых сайтов, обнаруженных с использованием контрольной концентрации белка Cas9 192 нМ и 64 нМ в биохимическом анализе, показано в **таблице 18**.

[00437] **Таблица 18. Биохимический нецелевой анализ**

SEQ ID NO:	ID направляющей	Мишень	Количество сайтов
27	G013675	CIITA	16
28	G013676	CIITA	124
200	G000644	EMX1	276
201	G000645	VEGFA	3259
202	G000646	RAG1B	32

10.2 Целевое секвенирование для проверки потенциальных нецелевых сайтов

[00438] Потенциальные нецелевые сайты, предсказанные с помощью анализов обнаружения, таких как использованный выше биохимический метод, можно оценить с помощью целевого секвенирования идентифицированных потенциальных нецелевых сайтов, чтобы определить, обнаружено ли нецелевое расщепление в этом сайте.

[00439] В одном подходе Cas9 и интересующую онРНК (например, онРНК, имеющая потенциальные нецелевые сайты для оценки) вводят в первичные Т-клетки. Затем Т-клетки лизируют и используют праймеры, фланкирующие потенциальные нецелевые сайты, для создания ампликона для NGS-анализа. Идентификация инделов на определенном уровне может подтвердить а потенциальный нецелевой сайт, тогда как отсутствие инделей, обнаруженных на потенциально нецелевом сайте, может указывать на ложноположительный результат нецелевого прогностического анализа, который был использован.

Пример 11. Множественное редактирование Т-клеток с последовательной доставкой LNP

[00440] Т-клетки были сконструированы с серией генных нарушений и вставок. Клетки от здорового донора обрабатывали последовательно четырьмя композициями

LNP, при этом каждая LNP содержала мРНК, кодирующую Cas9 (SEQ ID NO. 802) и онРНК, нацеленной на TRAC (G013006), TRBC (G016239), CIITA (G013676) или HLA-A (G018995). Композиции LNP были составлены с липидом A, холестерином, DSPC и PEG2k-DMG в молярном соотношении 50:38,5:10:1,5 соответственно. Составные композиции липида и нуклеиновой кислоты составляли с молярным соотношением амина липида к фосфату РНК (N:P) около 6 и соотношением нРНК к мРНК 1:2 по массе. Трансгенный Т-клеточный рецептор, нацеленный на антиген опухоли Вильмса (WT1 TCR) (SEQ ID NO: 1000) интегрировали в участок разреза TRAC путем доставки шаблона направленной гомологии репарации с использованием AAV.

11.1. Подготовка Т-клеток

[00441] Т-клетки выделяли из продуктов лейкафереза трех здоровых доноров HLA-A2+ (STEMCELL Technologies). Т-клетки выделяли с использованием набора для выделения Т-клеток человека EasySep (STEMCELL Technologies, кат. 17951) в соответствии с протоколом производителя и криоконсервировали с применением Cryostor CS10 (STEMCELL Technologies, кат. 07930). За день до начала редактирования Т-клеток, клетки размораживали и оставляли на ночь в среде для активации Т-клеток (TCAM): CTS OpTmizer (Thermofisher, кат. A3705001) с добавлением 2,5% сыворотки человека AB (Gemini, кат. 100-512), 1X GlutaMAX (Thermofisher, кат. 35050061), 10 мМ HEPES (Thermofisher, кат. 15630080), 200 Ед/мл IL-2 (Peprotech, кат. 200-02), IL-7 (Peprotech, кат. 200-07), IL-15 (Peprotech, кат. 200-15).

11.2. Лечение LNP и размножение Т-клеток

[00442] Композиции LNP были подготовлены каждый день в среде, содержащей ApoE, и доставляли в Т-клетки, как описано в **Таблице 19** и ниже.

[00443] **Таблица 19. Порядок редактирования Т-клеточной инженерии**

Группа	**День 1**	**День 2**	**День 3**	**День 4**
1	Неотредактированные	Неотредактированные	Неотредактированные	Неотредактированные
2	TRBC	CIITA	TRAC	HLA-A
3	TRBC	HLA-A	TRAC	CIITA
4	TRBC		TRAC	

[00444] В день 1 композиции LNP, как указано в **Таблице 19**, инкубировали в концентрации 5 мкг/мл в TCAM, содержащей 5 мкг/мл rhApoE3 (Peprotech, кат. 350-02). Тем временем Т-клетки собирали, промывали и ресуспендировали при плотности $2\times10^{\wedge6}$ клеток/мл в TCAM с разведением 1:50 реагента человека T Cell TransAct (Miltenyi, кат. № 130-111-160). Т-клетки и среду LNP-ApoE смешивали в соотношении 1:1 и Т-клетки высевали в культуральные флаконы на ночь.

[00445] В день 2 композиции LNP, как указано в Таблице 19, инкубировали в концентрации 25 мкг/мл в TCAM, содержащей 20 мкг/мл rhApoE3 (Peprotech, кат. 350-02). Затем к соответствующей культуре добавляли раствор LNP-ApoE в соотношении 1:10.

[00446] На 3-й день композиции TRAC-LNP инкубировали в концентрации 5 мкг/мл в TCAM, содержащей 10 мкг/мл rhApoE3 (Peprotech, кат. 350-02). Т-клетки собирали, промывали и ресуспендировали при плотности $1\times10^{\wedge6}$ клеток/мл в TCAM. Т-клетки и среду LNP-ApoE смешивали в соотношении 1:1 и Т-клетки высевали в культуральные флаконы. WT1 AAV (SEQ ID NO: 1000) затем добавляли к каждой группе при MOI $3\times10^{\wedge5}$ копий генома/клетку.

[00447] В день 4 композиции LNP, как указано в **Таблице 19**, инкубировали в концентрации 5 мкг/мл в TCAM, содержащей 5 мкг/мл rhApoE3 (Peprotech, кат. 350-02). Затем к соответствующей культуре добавляли раствор LNP-ApoE в соотношении 1:1.

[00448] На 5-11 день Т-клетки переносили в 24-луночный планшет GREX (Wilson Wolf, кат. 80192) в среде для размножения Т-клеток (TCEM): CTS OpTmizer (Thermofisher, кат. A3705001) с добавлением 5% заменителя сыворотки иммунных клеток CTS (Thermofisher, кат. A2596101), 1X GlutaMAX (Thermofisher, кат. 35050061), 10 мМ HEPES (Thermofisher, кат. 15630080), 200 Ед/мл IL-2 (Peprotech, кат. 200-02), IL-7 (Peprotech, кат. 200-07) и IL-15 (Peprotech, кат. 200-15). Клетки размножали в соответствии с протоколами производителей. Т-клетки размножали в течение 6 дней с заменой среды через день. Клетки подсчитывали с применением счетчика клеток Vi-CELL (Beckman Coulter) и рассчитывали кратность путем деления выхода клеток на исходный материал, как продемонстрировано в **Таблице 20.**

[00449] **Таблица 20 - Расширение складок после мультиредактирования Т-клеток**

Группа	Донор A	Донор B	Донор C	Среднее	SD
1	331,40	362,24	533,18	408,94	108,69
2	61,82	72,15	116,13	83,37	28,84
3	64,08	76,29	157,75	99,37	50,92
4	Нет данных	146,78	331,67	239,22	130,74

11.3. Количественная оценка редактирования Т-клеток с помощью проточной цитометрии и NGS

[00450] После размножения отредактированные Т-клетки анализировали с помощью проточной цитометрии для определения экспрессии HLA-A2 (HLA-A^+), экспрессии HLA-DR-DP-DQ (MHC II^+) после нокдауна CIITA, экспрессии WT1-TCR ($CD3^+$ $Vb8^+$) и экспрессия остаточных эндогенных TCR ($CD3^+$ $Vb8^-$) или неправильно спаренных TCR ($CD3^+$ $Vb8^{low}$). Т-клетки инкубировали с коктейлем антител, нацеленных на следующие молекулы: CD4 (Biolegend, кат. 300524), CD8 (Biolegend, кат. 301045), Vb8 (Biolegend, кат. 348106), CD3 (Biolegend, кат. 300327), HLA-A2 (Biolegend, кат. 343306), HLA-DRDPDQ (Biolegend, кат. 361706), CD62L (Biolegend, кат. 304844), CD45RO (Biolegend, кат. 304230). Затем клетки промывали, анализировали на приборе Cytoflex LX (Beckman Coulter) с помощью пакета программ FlowJo. Т-клетки отбирали по размеру и статусу CD4/CD8 до того, как определяли экспрессию маркеров редактирования и

вставки. Процент клеток, экспрессирующих соответствующие белки клеточной поверхности после последовательной инженерии Т-клеток, показан в **таблице 21** и на **Фиг. 7A-F** для $CD8^+$ Т-клеток, и **таблице 22** и на **Фиг. 8A-F** для $CD4^+$ Т-клеток. Процент полностью отредактированных $CD4^+$ или $CD8^+$ Т-клеток определяли как % $CD3^+$ $Vb8^+$ HLA-A^-МНС II-. В отредактированных образцах наблюдаются высокие уровни нокдауна HLA-A и МНС II, а также вставка WT1-TCR и эндогенный TCR KO. В дополнение к анализу с помощью проточной цитометрии геномная ДНК была подготовлена и проводили анализ NGS, как описано в **Примере 1**, для определения скорости редактирования в каждом целевом сайте. **Таблица 23** и **Фиг. 9A-D** продемонстрированы результаты процентного редактирования локусов CIITA, HLA-A и TRBC1/2, при этом закономерности в группах соответствуют с тем, что было идентифицировано с помощью проточной цитометрии. Локусы TRBC1/2 были отредактированы до >90-95% во всех группах.

[00451] **Таблица 21. Процент клеток CD8+ с фенотипом клеточной поверхности после последовательной инженерии Т-клеток**

Донор	**Группа**	**% HLA-A^+**	**% МНС II^+**	**% WT1 TCR**	**% Неправильно спарены TCR**	**% Остаточный эндогенный TCR**	**% Полностью отредактированный**
		HLA-$A2^+$	HLA-DR-DP-DQ^+	$CD3^+$ $Vb8^+$	$CD3^+$ $Vb8^{low}$	$CD3^+$ $Vb8^-$	$CD3^+$ $Vb8^+$ HLA-$A2^-$ HLA-DR-DP-DQ^-
A	**1 Неотредактированный**	100,0	60,9	6,7	0,8	93,2	0,0
B		99,7	71,0	3,4	0,6	96,1	0,2
C		99,7	52,2	5,7	0,8	94,0	0,0
A	**2**	2,7	1,2	68,9	1,3	0,4	66,7
B		1,3	21,0	50,4	3,1	4,5	43,3
C		1,8	2,9	62,2	2,6	2,7	60,3
A	**3**	1,3	0,8	66,0	1,4	0,3	64,4
B		1,4	2,2	56,8	2,2	2,0	55,1
C		1,2	5,7	63,3	1,0	0,9	60,6
B	**4**	99,8	64,8	62,3	2,0	2,5	0,1
C		99,0	51,5	71,0	1,0	0,5	0,4

[00452] **Таблица 22. Процент клеток CD4+ с фенотипом клеточной поверхности после последовательной инженерии Т-клеток**

		% HLA-A$^+$	% MHC II$^+$	% WT1 TCR	% Неправильно спарены TCR	% Остаточный эндогенный TCR	% Полностью отредактированный
Донор	**Группа**	HLA-A2$^+$	HLA-DR-DP-DQ$^+$	CD3$^+$ Vb8$^+$	CD3$^+$ Vb8^{low}	CD3$^+$ Vb8$^-$	CD3$^+$ Vb8$^+$ HLA-A2$^-$ HLA-DR-DP-DQ$^-$
A	**1 Неотредактированные**	100,0	36,3	5,4	0,4	94,5	0,0
B		98,7	27,6	5,6	0,4	94,3	0,0
C		99,3	32,3	6,2	0,3	93,6	0,1
A	**2**	2,6	0,7	62,4	2,4	1,1	60,9
B		1,8	0,5	59,7	2,2	1,0	58,5
C		1,7	3,2	58,6	1,6	1,8	55,8
A	**3**	1,3	0,8	63,0	3,4	0,8	61,7
B		1,1	1,1	61,8	2,6	0,9	60,6
C		1,1	0,4	60,9	1,7	1,0	59,9
B	**4**	99,5	25,1	61,9	1,9	5,2	0,1
C		97,9	40,1	69,5	4,7	1,9	0,8

[00453] **Таблица 23. Процент инделов в CIITA, HLA-A, TRBC1 и TRBC2 после последовательного редактирования Т-клеток**

	CIITA (G013676)			**HLA-A (G018995)**			**TRBC1** (G016239)			**TRBC2** (G016239)		
Группа	**Донор A**	**Донор B**	**Донор C**	**Донор A**	**Донор B**	**Донор C**	**Донор A**	**Донор B**	**Донор C**	**Донор A**	**Донор B**	**Донор C**
1	0,2	0,2	0,2	6,9	3,3	2,3	0,1	0,3	0,2	0,3	0,3	0,3
2	98,2	81,8	93,8	94,1	90,2	90,6	97,6	89,9	91,4	98,7	86,8	94,9
3	98,9	98,1	98,9	97,2	86,4	93,1	98,6	94,4	94,7	98,6	94,2	96,6
4	0,1	0,2	0,6	7,6	2,7	3,2	98,9	94	95	98,6	93,2	97,4

Пример 12: Анализ функционального уничтожения NK-клеток

[00454] Т-клетки, отредактированные в различных комбинациях для разрушения CIITA, HLA-A или B2M или для сверхэкспрессии HLA-E, тестировали на их способность

сопротивляться уничтожению, опосредованному естественными клетками-киллерами (NK).

12.1. Сконструированные Т-клетки и очистка

[00455] После размораживания Т-клетки Pan CD3+ (StemCell, HLA-A*02.01/ A*03.01) высевали с плотностью 0,5×10^6 клеток/мл в среду RPMI для Т-клеток, состоящую из RPMI 1640 (Invitrogen, кат. 22400-089), содержащей 5% (об./об.) эмбриональной бычьей сыворотки, 1x глутамакса (Gibco, кат. 35050-061), 50 мкМ 2-меркаптоэтанола, 100 мкМ заменимых аминокислот (Invitrogen, кат. 11140-050), 1 мМ пирувата натрия, 10 мМ буфера HEPES, 1% пенициллин-стрептомицина и 100 ЕД/мл рекомбинантного интерлейкина-2 человека (Peprotech, кат. 200-02). Т-клетки активировали с помощью TransAct™ (разведение 1:100, Miltenyi Biotec).

[00456] Как описано в **Таблице 24**, через один день после активации Т-клетки редактировали, чтобы разрушить ген B2M. Вкратце, композиции LNP, содержащие мРНК Cas9 и онРНК G000529 (SEQ ID NO: 216), нацеленные на B2M, были сформулированы, как описано в **Примере 1**. Композиции LNP инкубировали в среде на основе RPMI с цитокинами, как описано выше, с добавлением 1 мкг/мл рекомбинантного ApoE3 человека (Peprotech, кат. 350-02) в течение 15 минут при 37 °C. Смесь LNP добавляли к двум миллионам активированных Т-клеток, чтобы получить конечную концентрацию 2,5 мкг общего количества LNP/мл.

[00457] **Таблица 24 - Порядок последовательного редактирования и трансдукции вируса**

Условие	**День 1**	**День 2**	**День 3**
Неотредактированные			
$B2M^-$	B2M LNP		
$B2M^-$ + HLA-E	B2M LNP		Лентивирус HLA-E
$HLA\text{-}A^-$ $MHC\ II^-$		CIITA LNP	HLA-A LNP
$HLA\text{-}A^-$			HLA-A LNP

[00458] Через два дня после активации дополнительные Т-клетки редактировали композициями LNP, чтобы разрушить ген CIITA. Это выполняли, как описано для редактирования B2M, с применением композиций LNP, содержащих мРНК Cas9 и онРНК G013675 (онРНК, содержащая SEQ ID NO: 27, как продемонстрировано в Таблице 2) нацеленной на CIITA. Композиции LNP, применяемые на этом этапе, были приготовлены с липидом A, холестерином, DSPC и PEG2k-DMG в молярном соотношении 50:38,5:10:1,5 соответственно. Составные композиции липида и нуклеиновой кислоты составляли с молярным соотношением амина липида к фосфату РНК (N:P) около 6 и соотношением нРНК к мРНК 1:2 по массе.

[00459] Через три дня после активации все отредактированные и неотредактированные клетки ресуспендировали в свежей среде без TransAct. Образец Т-клеток с отредактированным B2M трансдуцировали центрифугированием при 1000 g при

37°C в течение 1 часа с применением лентивируса, экспрессирующего HLA-E, с промотора EF1a (SEQ ID NO: 1004) при MOI 10. Образец Т-клеток, отредактированный CIITA, дополнительно редактировали композициями LNP, чтобы разрушить ген HLA-A. Редактирование выполняли, как описано выше для редактирования B2M, с применением композиций LNP, содержащих мРНК Cas9 и онРНК G019000, нацеленных на HLA-A, в состав которых входили липид A, холестерин, DSPC и PEG2k-DMG в молярном соотношении 50:38.5:10:1.5 соответственно. Составные композиции липида и нуклеиновой кислоты составляли с молярным соотношением амина липида к фосфату РНК (N:P) около 6 и соотношением нРНК к мРНК 1:2 по массе. Через четыре дня после активации все клетки переносили на планшет GREX (Wilson Wolf, кат. 80240M) для размножения.

[00460] Через семь дней после активации, HLA-E инфицированные Т-клетки отбирали для экспрессии HLA-E с применением биотинилированных антител анти-HLA-E (Biolegend), антибиотиновых микрогранул (Miltenyi Biotec, кат. № 130-090-485) и магнитной колонки LS (Miltenyi Biotec, кат. № 130-042-401) в соответствии с протоколами производителя.

[00461] Аналогичным образом, через девять дней после активации Т-клетки с отредактированные CIITA, были отобраны отрицательно из-за отсутствия экспрессии MHC II с использованием биотинилированного антитела к HLA-класса II (Miltenyi, кат. 130-104-823), антибиотиновых микрогранул (Miltenyi Biotec, кат. 130-090-485) и магнитной колонки LS (Miltenyi Biotec, кат. 130-042-401) согласно протоколам производителя..

12.2 Проточная цитометрия

[00462] Оценивали опосредованную NK-клетками цитотоксичность по отношению к сконструированным Т-клеткам. Для этого Т-клетки совместно культивировали с HLA-B/C-совместимыми CTV-мечеными NK-клетками при соотношениях эффектор/мишень (E:T) 10:1, 5:1, 2,5:1, 1,25:1 и 0,625:1 на 21 час. Клетки окрашивали 7AAD (BD Pharmingen, кат. 559925), затем клетки обрабатывали на проточном цитометре Cytoflex (Beckman Coulter) и анализировали с использованием пакета программного обеспечения FlowJo. Т-клетки были отобраны на основании CTV негативности, размера, формы и жизнеспособности. В **Таблице 25** и на **Фиг. 10** продемонстрирован процент лизиса Т-клеток после заражения NK-клетками.

[00463] **Таблица 25 - Процент лизиса Т-клеток после заражения NK-клетками сконструированных Т-клеток**

Журнал (E:T)	**Неотредактированные**		**HLA-A$^-$**		**HLA-A$^-$ MHC II$^-$**		**B2M$^-$**		**B2M$^-$ + HLA-E**		
	Среднее	**SD**	**Среднее**	**SD**	**Среднее**	**SD**	**Среднее**	**SD**	**Среднее**	**SD**	**n**
Базальны	12,0	1,9	15,5	0,2	8,2	0,4	11,1	0,	18,1	2,5	2

й								1			
-0,20	15,1	0,0	16,0	0,5	11,2	0,8	32,6	1,6	25,0	0,9	2
0,10	14,5	0,2	15,6	0,4	10,6	0,1	44,7	2,3	29,4	0,1	2
0,40	12,8	0,6	13,6	0,4	9,3	0,1	66,0	1,8	39,3	0,1	2
0,70	10,4	0,4	11,9	0,2	9,2	0,4	71,2	1,3	51,9	1,6	2
1,00	8,4	0,1	9,4	0,6	7,6	0,1	62,8	0,6	51,7	2,8	2

Пример 13: HLA-A и CIITA, частично совпадающие в мышиной модели уничтожения in vivo посредством NK-клеток

[00464] Самкам мышей NOG-hIL-15 прививали 1,5×10^6 первичных NK-клеток с последующей инъекцией сконструированных Т-клеток, содержащих люциферазу +/- HLA-A, CIITA или HLA-A/CIITA KO через 4 недели, чтобы определить 1) могут ли привитые NK-клетки легко лизировать контрольные Т-клетки ($B2M^{-/-}$), и 2) обеспечивает ли добавление частично совпадающего редактирования (HLA-A или CIITA) защитный эффект для Т-клеток от лизиса NK-клетками in vivo.

13.1. Приготовление Т-клеток, содержащих люциферазу +/- HLA-A, CIITA или HLA-A/CIITA KO

[00465] Т-клетки выделяли из периферической крови здорового донора-человека со следующим фенотипом MHC I: HLA-A*02:01:01G, 03:01:01G, HLA-B*07:02:01G, HLA-C*07:02:01G. Вкратце, лейкаферезный пакет (Stemcell Technologies) обрабатывали буфером для лизиса эритроцитов с хлоридом аммония (Stemcell Technologies; кат. № 07800) в течение 15 минут для лизиса эритроцитов. Количество мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC) определяли после лизиса а выделение Т-клеток осуществляли с применением набора для выделения Т-клеток человека EasySep (Stemcell Technologies, кат. № 17951) согласно протоколу производителя. Выделенные CD3+ Т-клетки ресуспендировали в среде Cryostor CS10 (Stemcell Technologies, кат. 07930) и замораживали в жидком азоте до дальнейшего применения.

[00466] Замороженные Т-клетки размораживали при концентрации клеток 1×10^6 клеток/мл в среде для роста Т-клеток (TCGM), состоящей из OpTmizer TCGM, как описано в Примере 3, с дополнительным добавлением 100 Ед/мл рекомбинантного интерлейкина-2 человека (Peprotech, кат. 200-02), 5 нг/мл IL-7 (Peprotech, кат. 200-07), 5 нг/мл IL-15 (Peprotech, кат. 200-15). Клетки активировали с использованием T-cell TransAct™ (Miltenyi Biotec, кат. 130-111-160) в разведении 1:100 при 37 °C в течение 24 часов.

[00467] Через 24 часа после активации 1×10^6 Т-клеток в 500 мкл свежего TCGM без цитокинов трансдуцировали путем центрифугирования 1000xG в течение 60 минут при 37°C со 150 мкл люциферазы лентивируса (Imanis Life Sciences, кат. № LV050L). Трансдуцированные клетки размножали в 24-луночном планшете G-Rex (Wilson Wolf, кат. 80192M) в TCGM с цитокинами при 37 °C в течение 24 часов.

[00468] Через сорок восемь часов после активации, Т-клетки, инфицированные люциферазой LV едактировали, чтобы разрушить гены B2M или HLA-A. Вкратце, композиции LNP, содержащие мРНК, кодирующую cas9 (SEQ ID NO:802), и онРНК G019000 (SEQ ID NO: 217) нацеленные на HLA-A, составляли с липидом A, холестерином, DSPC и PEG2k-DMG в молярном соотношении 50:38,5:10:1,5 соответственно. Составные композиции липида и нуклеиновой кислоты составляли с молярным соотношением амина липида к фосфату РНК (N:P) около 6 и соотношением нРНК к мРНК 1:2 по массе. Композиции LNP, содержащие мРНК Cas9 и онРНК G000529 (SEQ ID NO: 216), нацеленные на B2M, были сформулированы, как описано в **Примере 1**. Композиции LNP инкубировали в Optmizer TCGM без сыворотки или цитокинов, дополнительно дополненных 1 мкг/мл рекомбинантного ApoE3 человека (Peprotech, кат. 350-02) в течение 15 минут при 37 °C. Т-клетки промывали и суспендировали в TCGM с цитокинами. Предварительно инкубированные LNP и Т-клетки смешивали для получения конечных концентраций 0.5e6 Т-клеток/мл и 2,5 мкг общей РНК/мл LNP в среде TCGM с 5% сыворотки AB человека, 100 Ед/мл рекомбинантного интерлейкина-2 человека (Peprotech, кат. № 200-02), 5 нг/мл IL-7 (Peprotech, кат. 200-07), 5 нг/мл IL-15 (Peprotech, кат. 200-15). Дополнительную группу клеток имитировали редактированием со средой, содержащей ApoE3, но без композиций LNP. Все клетки инкубировали при 37°C в течение 24 часов.

[00469] Через семьдесят два часа после активации клетки редактировали, чтобы разрушить CIITA, и LNP вводили либо в клетки, отредактированные с люциферазой и HLA-A, либо только в клетки с люциферазой. Вкратце, клетки трансдуцировали композициями LNP, содержащими мРНК Cas9 и онРНК G013675 (онРНК, содержащая SEQ ID NO: 27, как показано в таблице 2), как описано для редактирования HLA-A. Через 96 часов после активации клетки промывали и переносили в 24-луночный планшет G-Rex. Среду со свежими цитокинами заменяли каждые 2 дня. На день 15 после активации, отредактированные Т-клетки сортировали на клетках GFP^+ с применением BD FACS Aria Flow Sorter для обогащения клетками, которые экспрессируют люциферазу. Для группы люциферазы B2M KO, клетки сортировали по GFP^+и MHC-I^-. Отсортированные клетки выдерживали в течение ночи в среде TCGM с цитокинами в инкубаторе при 37 °C. На следующий день Т-клетки повторно стимулировали T-cell TrasnAct™ в разведении 1:100 в течение 24 часов. Через 24 часа после повторной стимуляции, TransAct вымывали, а Т-клетки культивировали и выдерживали на планшете G-Rex в течение 15 дней с регулярными заменами среды и цитокинов.

[00470] Через пятнадцать дней после повторной стимуляции, опосредованную NK-

клетками цитотоксичность по отношению к сконструированным Т-клеткам анализировали in vitro, как в **Примере 12**, со следующими исключениями. Анализы проводили с применением OpTmizer TCGM с 100 мкл/мл IL-2. Т-клетки совместно культивировали в течение ночи с HLA-B/C-совместимыми CTV-мечеными NK-клетками при соотношениях эффектор/мишень (E:T) 10:1, 5:1, 2,5:1, 1,25:1 и 0,625:1. Клетки инкубировали с реагентами BrightGlo Luciferase (Promega, кат. E2620) и обрабатывали в программе CellTiter Glo в ClarioStar для определения лизиса Т-клеток NK-клетками на основе сигнала люциферазы. В **таблице 26** показан процент лизиса Т-клеток после заражения NK-клетками. In vitro, B2M-отредактированные клетки продемонстрировали чувствительность к уничтожению посредством NK, в то время как HLA-A-отредактированные клетки, CIITA-отредактированные клетки и вдвойне (HLA-A, CIITA) отредактированные клетки продемонстрировали защиту от лизиса, опосредованного NK.

[00471] **Таблица 26 - Процент лизиса Т-клеток, трансдуцированных люциферазой, после внесения NK-клеток**

	Без редактирования		**HLA-A KO**		**CIITA KO**		**HLA-A KO, CIITA KO**		**B2M KO**		
E:T	**Среднее**	**SD**	**Среднее**	**SD**	**Среднее**	**SD**	**Среднее**	**SD**	**Среднее**	**SD**	**n**
10	19,22	3,16	28,55	1,02	22,96	3,59	22,22	3,15	68,09	0,11	2
5	13,04	1,71	27,18	4,35	22,85	6,93	13,78	4,55	53,87	3,30	2
2,5	1,56	1,35	26,56	3,75	26,59	2,44	21,32	0,72	39,46	7,05	2
1,25	-0,26	1,94	19,78	3,24	19,91	5,38	12,86	0,54	25,79	7,96	2
0,625	8,67	6,81	25,44	0,23	18,32	4,28	19,80	7,20	29,31	2,67	2
0,3125	2,96	7,66	22,40	0,83	19,13	1,34	13,34	2,48	9,32	0,84	2

13.2. Т-клетки с двойным нокаутом HLA-A и CIITA защищены от уничтожения посредством NK-клеток

[00472] Для исследования in vivo NK-клетки, выделенные из лейкопака способами, известными в данной области, промывали HBSS (Gibco, кат. № 14025-092) и ресуспендировали в концентрации $10\times10^{\wedge6}$ клеток/мл для инъекций в 150 мкл HBSS. Двадцати двум самкам мышей NOG-hIL-15 (Taconic) путем инъекции в хвостовую вену вводили 1.5e6 выделенных NK-клеток. Дополнительно 27 самок NOG-hIL-15 служили контролем без инъекций NK.

[00473] Через двадцать восемь дней после инъекции NK-клеток, мышам вводили неотредактированные или сконструированные Т-клетки, как описано в **Таблице 26.** Вкратце, сконструированные Т-клетки вводили через 16 дней после второй активации после промывания в PBS и ресуспендирования в растворе HBSS в концентрации $6\times10^{\wedge6}$

клеток/150 мкл.

[00474] Визуализацию IVIS живых мышей проводили для идентификации люциферазоположительных Т-клеток по спектру IVIS. Визуализацию IVIS проводили через 6 часов, 24 часа, 48 часов, 8 дней, 13 дней, 18 дней и 27 дней после инъекции Т-клеток. Мышей готовили к визуализации с помощью инъекции D-люциферина внутрибрюшинно в дозе 10 мкг/г массы тела в соответствии с рекомендацией производителя, около 150 мкл на животное. Животных анестезировали, а затем помещали в блок визуализации IVIS. Визуализацию выполняли с автоматически установленным временем экспозиции, полем зрения D, средним биннингом и значением F/stop равным 1. В **таблице 27** и на **фиг. 11A** показано излучение (фотоны/с/см2/ср) от экспрессирующих люциферазу Т-клеток, присутствующих в различные моменты времени после инъекции. На **Фиг. 11B** показано излучение (фотоны/с/см2/sr) от экспрессирующих люциферазу Т-клеток, присутствующих в различных группах мышей через 27 дней. In vitro, B2M-отредактированные клетки продемонстрировали чувствительность к уничтожению посредством NK, в то время как HLA-A-отредактированные клетки, CIITA-отредактированные клетки и вдвойне (HLA-A, CIITA) отредактированные клетки продемонстрировали защиту от лизиса, опосредованного NK. Неожиданно было обнаружено, что даже после снижения уровня одного из трех высокополиморфных белков MHC класса I (HLA-A) клетки оказались защищены от NK-опосредованного отторжения.

[00475] **Таблица 27 - Излучение (фотоны/с/см2/sr) от Т-клеток, экспрессирующих люциферазу, у обработанных мышей с интервалами после инъекции Т-клеток.**

Инъекция Т-клеток	**Момент времени (дни)**	**Без инъекции NK-клеток**			**Инъекция NK-клеток**		
		Среднее	**SD**	**n**	**Среднее**	**SD**	**n**
Т-клетки отсутствуют	0,25	5065	474	2	6010	651	2
	1	5225	431	2	5150	467	2
	4	4715	403	2	4860	57	2
	6	5145	884	2	5110	226	2
	11	5230	382	2	4700	99	2
	13	6920	948	2	6735	35	2
	18	5055	148	2	5570	28	2
	27	4740	311	2	5185	290	2
Без редактирования	0,25	477200	51237	5	464000	112493	4
	1	547600	59315	5	517500	95710	4
	4	285600	43328	5	219750	77298	4
	6	249400	58748	5	137000	69190	4

	11	131500	28671	5	111150	36287	4
	13	147000	15732	5	43168	52128	4
	18	112100	20768	5	55825	47391	4
	27	53960	13546	5	59700	31479	4
B2M KO	0,25	662600	193865	5	261850	135636	4
	1	555200	122508	5	89400	41151	4
	4	266200	68845	5	25175	11072	4
	6	202600	41825	5	18500	7048	4
	11	106320	14377	5	17100	9440	4
	13	57714	45535	5	7048	2735	4
	18	77080	7792	5	9453	4592	4
	27	55240	12780	5	6860	1207	4
HLA-A KO	0,25	160000	30315	5	111500	30533	4
	1	206800	38493	5	153000	24427	4
	4	120200	23488	5	91025	69091	4
	6	81100	16903	5	91408	106141	4
	11	55520	6843	5	53367	21985	3
	13	30716	23658	5	33233	13615	3
	18	21802	10911	5	35667	5601	3
	27	20600	808	4	46900	4937	3
CIITA KO	0,25	121400	19680	5	116350	82606	4
	1	168200	32760	5	120225	43535	4
	4	93600	23187	5	76450	31056	4
	6	71298	40161	5	52500	35590	4
	11	59100	13805	5	73500	77242	4
	13	43870	22810	5	31760	30831	4
	18	28422	14019	5	35000	7902	3
	27	18780	3505	5	69067	31194	3
HLA-A KO CIITA KO	0,25	259250	59824	4	363000	113731	4
	1	456750	69188	4	481500	142778	4
	4	170500	26665	4	200750	70415	4
	6	108950	11046	4	98633	27450	3
	11	97350	19982	4	93867	32173	3
	13	85708	58720	4	68357	54428	3

	18	20923	22172	4	98633	27450	3
	27	37375	10602	4	31733	2593	3

Пример 14: HLA-A и CIITA, частично совпадающие в мышиной модели уничтожения in vivo посредством NK-клеток

[00476] Самкам мышей NOG-hIL-15 прививали 1,5×10^6 первичных NK-клеток с последующей инъекцией сконструированных Т-клеток, содержащих люциферазу +/- HLA-A/CIITA KO с TCR HD1, через 4 недели, чтобы определить 1) могут ли привитые NK-клетки легко лизировать контрольные Т-клетки ($B2M^{-/-}$), и 2) обеспечивает ли добавление частично совпадающего редактирования (HLA-A и CIITA) защитный эффект для Т-клеток с экзогенным TCR HD1 от лизиса NK-клетками in vivo.

14.1. Приготовление Т-клеток, содержащих люциферазу +/-HLA-A/CIITA KO и HD1 TCR

[00477] Т-клетки выделяли из периферической крови здорового донора-человека со следующим фенотипом MHC I: HLA-A*02:01:01G, 03:01:01G, HLA-B*07:02:01G, HLA-C*07:02:01G. Вкратце, лейкаферезный пакет (Stemcell Technologies) обрабатывали буфером для лизиса эритроцитов с хлоридом аммония (Stemcell Technologies; кат. № 07800) в течение 15 минут для лизиса эритроцитов. Количество мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC) определяли после лизиса, а выделение Т-клеток осуществляли с применением набора для выделения Т-клеток человека EasySep (Stemcell Technologies, кат. № 17951) согласно протоколу производителя. Выделенные CD3+ Т-клетки ресуспендировали в среде Cryostor CS10 (Stemcell Technologies, кат. 07930) и замораживали в жидком азоте до дальнейшего применения.

[00478] Замороженные Т-клетки оттаивали при концентрации клеток 1,5×10^6 клеток/мл в среде для активации Т-клеток (TCAM), состоящей из OpTmizer TCGM, как описано в **Примере 3**, и дополнительно добавляли 100 Ед./мл рекомбинантного человеческого интерлейкина-2 (Peprotech, кат. 200-02), 5 нг/мл IL-7 (Peprotech, кат. 200-07), 5 нг/мл IL-15 (Peprotech, кат. 200-15). Клетки выдерживали при 37 °C в течение 24 часов.

[00479] Через 24 часа после размораживания Т-клетки подсчитывали и ресуспендировали в концентрации 2×10^6 клеток/мл в среде TCAM и добавляли 1:50 Transact. Клетки перемешивали и инкубировали 20-30 мин при 37 °C. Композиции LNP, содержащие мРНК, кодирующую Cas9 (SEQ ID NO:802), и онРНК G013675 (онРНК, содержащая SEQ ID NO: 27, как показано в таблице 2, нацеленные на CIITA, составляли с липидом A, холестерином, DSPC и PEG2k-DMG в молярном соотношении 50:38,5:10:1,5 соответственно. Составные композиции липида и нуклеиновой кислоты составляли с молярным соотношением амина липида к фосфату РНК (N:P) около 6 и соотношением нРНК к мРНК 1:2 по массе. Композиции LNP в концентрации 5 мкг/мл инкубировали в OpTmizer TCAM с дополнительным добавлением 5 мкг/мл рекомбинантного ApoE3 человека (Peprotech, кат. 350-02) в течение 15 минут при 37 °C. Предварительно инкубированные композиции LNP и Т-клетки с Transact смешивали для получения

конечных концентраций 1×10^6 Т-клеток/мл и 2,5 мкг общей РНК/мл LNP в среде TCAM с 2,5% сыворотки АВ человека, 100 Ед/мл рекомбинантного интерлейкина-2 человека (Peprotech, кат. № 200-02), 5 нг/мл IL-7 (Peprotech, кат. 200-07), и 5 нг/мл IL-15 (Peprotech, кат. № 200-15). Дополнительную группу клеток имитировали редактированием со средой, содержащей ApoE3, но без композиций LNP. Все клетки инкубировали при 37°C в течение 24 часов.

[00480] Через 48 часов после активации все группы трансдуцировали лентивирусом EF1α-GFP-Luc. Лентивирус удаляли при температуре -80°C и оттаивали на льду. Клетки собирали по группам и центрифугировали при 500×g в течение 5 минут, чтобы вымыть композиции LNP и среду. Клетки ресуспендировали индивидуально в соответствии с их группами в концентрации 2×10^6 клеток/мл в среде TCAM. Затем 500 мкл клеточной суспензии переносили в стерильную пробирку Эппендорфа (всего 1×10^6 клеток) и добавляли 100 мкл лентивируса. Клетки центрифугировали при 1000×G в течение 60 минут при 37 °C. После центрифугирования клетки объединяли в соответствии с их группами и ресуспендировали в концентрации 1×10^6 клеток/мл в среде TCAM, содержащей конечную концентрацию 2,5% сыворотки человеческого АВ, 100 ЕД/мл рекомбинантного человеческого интерлейкина-2 (Peprotech, кат. 200-02), 5 нг/мл IL-7 (Peprotech, кат. 200-07), и 5 нг/мл IL-15 (Peprotech, кат. № 200-15) с последующей инкубацией при 37 °C в течение 24 часов.

[00481] Через семьдесят два часа после активации трансдуцированные люциферазой Т-клетки обрабатывали композициями LNP для разрушения генов TRAC и дополнительно обрабатывали HD1 AAV для встраивания TCR HD1 в локус TRAC. Клетки собирали по группам и центрифугировали при 500×g в течение 5 минут, чтобы вымыть лентивирус и среду. Затем клетки ресуспендировали в среде TCAM при концентрации 1×10^6 клеток/мл в среде TCAM. Композиции LNP, содержащие мРНК, кодирующую Cas9 (SEQ ID NO:802), и онРНК G013006 (SEQ ID NO: 203, на TRAC, составляли с липидом A, холестерином, DSPC и PEG2k-DMG в молярном соотношении 50:38,5:10:1,5 соответственно. Составные композиции липида и нуклеиновой кислоты составляли с молярным соотношением амина липида к фосфату РНК (N:P) около 6 и соотношением нРНК к мРНК 1:2 по массе. Композиции LNP в концентрации 5 мкг/мл инкубировали в OpTmizer TCAM с дополнительным добавлением 5 мкг/мл рекомбинантного ApoE3 человека (Peprotech, кат. 350-02) в течение 15 минут при 37 °C. Предварительно инкубированные композиции LNP и Т-клетки с Transact смешивали для получения конечных концентраций 1×10^6 Т-клеток/мл и 2,5 мкг общей РНК/мл LNP TCAM с 2,5% сыворотки АВ человека, 100 Ед/мл рекомбинантного интерлейкина-2 человека (Peprotech, кат. № 200-02), 5 нг/мл IL-7 (Peprotech, кат. 200-07), и 5 нг/мл IL-15 (Peprotech, кат. № 200-15). Флакон с EF1α-HD1 AAV размораживали на столе и добавляли к клеткам, обработанным TRAC LNP, в количестве 3×10^5 GC/клетку. Затем клетки инкубировали при 37 °C в течение 24 часов.

[00482] Затем через 96 часов после активации клетки обрабатывали для

заключительного цикла редактирования либо только с TRBC LNP, либо в комбинации с HLA-A LNP. Группу B2M KO обрабатывали B2M LNP. Клетки собирали по группам и центрифугировали при 500×g в течение 5 минут, чтобы вымыть композиции LNP и среду. Затем клетки ресуспендировали в среде TCAM при концентрации 1×10^6 клеток/мл в среде TCAM. Вкратце, композиции LNP, содержащие мРНК, кодирующую Cas9 (SEQ ID NO:802), и онРНК G018995 (SEQ ID NO: 214, нацеленные на HLA-A, были сформулированы, как описано в **Примере 1**). Композиции LNP, содержащие мРНК Cas9 и онРНК G000529 (SEQ ID NO: 216), нацеленные на B2M и композиции LNP, содержащие мРНК Cas9 и онРНК G016239 (SEQ ID NO: 211, на TRBC, составляли с липидом A, холестерином, DSPC и PEG2k-DMG в молярном соотношении 50:38,5:10:1,5 соответственно. Составные композиции липида и нуклеиновой кислоты составляли с молярным соотношением амина липида к фосфату РНК (N:P) около 6 и соотношением нРНК к мРНК 1:2 по массе. Композиции LNP в концентрации 5 мкг/мл инкубировали в OpTmizer TCAM с дополнительным добавлением 5 мкг/мл рекомбинантного ApoE3 человека (Peprotech, кат. 350-02) в течение 15 минут при 37 °C. Предварительно инкубированные композиции LNP и Т-клетки с Transact смешивали для получения конечных концентраций 1×10^6 Т-клеток/мл и 2,5 мкг общей РНК/мл LNP TCAM с 2,5% сыворотки АВ человека, 100 Ед/мл рекомбинантного интерлейкина-2 человека (Peprotech, кат. № 200-02), 5 нг/мл IL-7 (Peprotech, кат. 200-07), и 5 нг/мл IL-15 (Peprotech, кат. № 200-15). Для одновременного редактирования TRBC и HLA-A, LNP и ApoE3 составляли в 4-кратном увеличении конечной концентрации с последующим добавлением TRBC LNP сначала к Т-клеткам и инкубацией при 37°C в течение 15 минут. После инкубации добавляли предварительно составленные композиции HLA-A LNP, клетки инкубировали в течение 24 часов.

[00483] После последнего цикла редактирования клетки промывали вращением при 500xG в течение 5 минут и ресуспендировали в среде TCGM, содержащей 5% сыворотки АВ человека, 100 Ед/мл рекомбинантного интерлейкина-2 человека (Peprotech, кат. 200-02), 5 нг/мл IL-7 (Peprotech, кат. 200-07), и 5 нг/мл IL-15 (Peprotech, кат. № 200-15).

[00484] На день 5 после активации отредактированные Т-клетки сортировали на клетках GFP^+ с применением BD FACS Aria Flow Sorter для обогащения клетками, которые экспрессируют люциферазу. Отсортированные клетки выдерживали в течение ночи в среде TCGM с цитокинами в инкубаторе при 37 °C. На следующий день Т-клетки повторно стимулировали T-cell TrasnAct™ в разведении 1:100 в течение 24 часов. Через 24 часа после повторной стимуляции, TransAct™ вымывали, а Т-клетки культивировали и выдерживали на планшете G-Rex в течение 15 дней с регулярными заменами среды и цитокинов.

[00485] Через пятнадцать дней после первой рестимуляции уровни редактирования подтверждали с помощью проточной цитометрии, клетки промывали и ресуспендировали в буфере HBSS для инъекций.

14.2. Т-клетки с двойным нокаутом HLA-A и CIITA защищены от уничтожения

посредством NK-клеток

[00486] Для исследования in vivo NK-клетки, выделенные из лейкопака способами, известными в данной области, промывали HBSS (Gibco, кат. № 14025-092) и ресуспендировали в концентрации $10\times10^{\wedge6}$ клеток/мл для инъекций в 150 мкл HBSS. Тридцати самкам мышей NOG-hIL-15 (Taconic) вводили путем инъекции в хвостовую вену $1,5\times10^{\wedge6}$ выделенных NK-клеток. Дополнительно 25 самок NOG-hIL-15 служили в качестве контроля без инъекций NK.

[00487] Через двадцать восемь дней после инъекции NK-клеток, мышам вводили неотредактированные или сконструированные Т-клетки, как описано в **Таблице 28.** Вкратце, $0,2\times10^{\wedge6}$ сконструированных Т-клеток вводили через 16 дней после второй активации после промывания в PBS и ресуспендирования в растворе HBSS в концентрации $6.0\times10^{\wedge6}$ клеток/150 мкл.

[00488] Визуализацию IVIS живых мышей проводили для идентификации люциферазоположительных Т-клеток по спектру IVIS. Визуализация IVIS проводили через 24 часа, 48 часов, 72 часа, 6 дней, 10 дней, 13 дней, 17 дней, 20 дней, 24 дня, 27 дней, 31 день, 34 дня, 38 дней, 42 дня, 44 дня, 48 дней, 55 дней, 63 дня, 72 дня, 77 дней, 85 дней и 91 день после инъекции Т-клеток. Мышей готовили к визуализации с помощью инъекции D-люциферина внутрибрюшинно в дозе 10 мкг/г массы тела в соответствии с рекомендацией производителя, около 150 мкл на животное. Животных анестезировали, а затем помещали в блок визуализации IVIS. Визуализацию выполняли с автоматически установленным временем экспозиции, полем зрения D, средним биннингом и значением F/stop равным 1. **Таблица 29** и **Фиг. 12A** демонстрируют излучение (фотоны/с/см2/sr) от экспрессирующих люциферазу Т-клеток, присутствующих в различные моменты времени после инъекции вплоть до 91 дня. **На Фиг. 12B** демонстрирует излучение (фотоны/с/$см^2$/sr) от экспрессирующих люциферазу Т-клеток, присутствующих в различных группах мышей через 31 день. In vivo, B2M-отредактированные клетки продемонстрировали чувствительность к уничтожению посредством NK, в то время как вдвойне (HLA-A, CIITA) отредактированные клетки продемонстрировали защиту от лизиса, опосредованного NK.

[00489] **Таблица 28 - Конструирование Т-клеток**

Группа	День 0	День 1	День 2	День 3	День 4	День 6	День 7	День 8	День 16
HLA-A CIITA KO	Размораживание	CIITA	GFP-Luc LV	TRAC+AAV	TRBC, HLA-A	Поток и сортировка	Повторная стимуляция	Размножение на G-Rex	Промывание и введение
B2M	Размора	B2M	GFP-	TRAC+A	TRBC	Пото	Повтор	Размно	Промы

Контроль	живание		Luc LV	AV		к и сортировка	ная стимуляция	жение на G-Rex	вание и введение
Без редактирования	Размораживание	-	GFP-Luc LV	-	-	Поток и сортировка	Повторная стимуляция	Размножение на G-Rex	Промывание и введение

[00490] **Таблица 29 - Общий поток (фотонов/с) от Т-клеток, экспрессирующих люциферазу, у мышей, получавших инъекции Т-клеток, в определенные моменты времени**

Инъекция Т-клеток	Момент времени (дни)	Без инъекции NK-клеток			Инъекция NK-клеток		
		Средний	CO	n	Средний	CO	n
Т-клетки отсутствуют	1	1170000	0	1	1060000	0	1
	2	884000	0	1	728000	0	1
	3	1090000	0	1	771000	0	1
	6	1040000	0	1	888000	0	1
	10	741000	0	1	799000	0	1
	13	1350000	0	1	751000	0	1
	17	1210000	0	1	709000	0	1
	20	1530000	0	1	1190000	0	1
	24	1280000	0	1	823000	0	1
	27	1430000	0	1	577000	0	1
	31	1310000	0	1	970000	0	1
	34	1840000	0	1	800000	0	1
	38	937000	0	1	750000	0	1
	42	1450000	0	1	757000	0	1
	44	1770000	0	1	797000	0	1
	48	1850000	0	1	666000	0	1
	55	1170000	0	1	723000	0	1
	63	1680000	0	1	799000	0	1
	72	1400000	0	1	840000	0	1

	77	1570000	0	1	801000	0	1
	85	1220000	0	1	770000	0	1
	91	1580000	0	1	905000	0	1
Без редактирования	1	37560000	34014482.9	5	27882000	27141262.31	5
	2	40698000	22307084.5	5	28640000	14568047.23	5
	3	34210000	18847559.5	5	25692000	14362636.25	5
	6	51440000	10855551.6	5	37700000	34510288.32	5
	10	29460000	5028220.36	5	34060000	24420544.63	5
	13	17350000	8731122.49	5	42864000	47552123.82	5
	17	17380000	4065956.22	5	124180000	217126534.5	5
	20	35860000	9912012.91	5	329720000	644006666.9	5
	24	41400000	6393355.93	5	1784780000	3583692731	5
	27	70500000	28116809.9	5	9112600000	19172106869	5
	31	124260000	57196923	5	14383000000	27254468202	5
	34	313000000	256943574	5	17450000000	24859612829	5
	38	667800000	614512978	5	25316000000	26111305597	5
	42	1727400000	1703225998	5	21084000000	16956611690	5
	44	2101400000	2213844349	5	16975000000	13721121188	4
	48	5068000000	4995313854	5	15106666667	11613532337	3
	55	6386750000	5350377767	4	16303333333	11913187371	3
	63	8105750000	6722716632	4			
	72						
	77						
	85						
	91						

B2M KO	1	96334000	62882587.3	5	7192000	6901425.215	5
	2	138300000	57619007.3	5	7296000	2213194.524	5
	3	117980000	43943736.8	5	7342000	2837475.991	5
	6	104240000	34772230.3	5	7276000	2743998.907	5
	10	81120000	19876921.3	5	6124000	1967035.841	5
	13	45386000	24729233.3	5	5748000	3248448.861	5
	17	50600000	19718899.6	5	4390000	902607.3343	5
	20	38200000	12211470	5	2772000	947507.2559	5
	24	32180000	17561520.4	5	4566000	1182742.576	5
	27	35840000	15497354.6	5	3626000	1995903.304	5
	31	41380000	12243243	5	3344000	1295812.486	5
	34	40740000	13481394.6	5	3864000	506635.964	5
	38	33980000	15116117.2	5	3468000	1330139.09	5
	42	38840000	15452605	5	3504000	688534.676	5
	44	35280000	19116929.7	5	3266000	910291.1622	5
	48	31600000	17624982.3	5	3196000	726691.1311	5
	55	38920000	30824779	5	2654000	475794.0731	5
	63	29300000	22330584.4	5	2530000	274135.0032	5
	72	19070000	13309188.6	5	2522000	437344.258	5
	77	30680000	24960508.8	5	2650000	531554.3246	5
	85	24738000	22937833.8	5	1816000	410524.0553	5
	91	18234000	10913394.5	5	1736000	297707.9105	5
HLA-A KO CIITA KO	1	63960000	33085918.5	5	59320000	32265414.92	5
	2	55412000	31461432.3	5	49560000	9862707.539	5
	3	64686000	39918742.2	5	41264000	22521777.9	5
	6	88440000	22053865.9	5	33442000	18099663.53	5
	10	68320000	18250397.3	5	42040000	4585084.514	5
	13	57880000	8452041.17	5	37028000	20443236.53	5
	17	39320000	11283040.4	5	41400000	10968135.67	5
	20	40480000	12259363.8	5	37540000	8371260.359	5
	24	39900000	18287017.3	5	37740000	9070446.516	5
	27	37800000	14406422.2	5	31840000	11387185.78	5
	31	46160000	13751836.2	5	25020000	11377477.75	5
	34	39820000	8990383.75	5	28980000	5348551.206	5

	38	42620000	8249363.61	5	31000000	7146677.55	5
	42	30740000	10083798.9	5	16928000	9138868.639	5
	44	31740000	9619667.35	5	26580000	7343500.528	5
	48	30740000	9147021.37	5	28620000	3141178.123	5
	55	27600000	5482244.07	5	21340000	3673281.911	5
	63	24820000	6599015.08	5	12428000	3646082.83	5
	72	10918000	3813609.84	5	13094000	3349355.162	5
	77	24840000	4728953.37	5	14200000	3801973.172	5
	85	15520000	4283923.44	5	14580000	2920102.738	5
	91	17260000	5452797.45	5	11256000	2456141.283	5

Пример 15: Эффективность MHCI и MHCII KO in vivo для Т-клеток HD1

[00491] Самкам мышей NOG-hIL-15 прививали $0,2\times10^{\wedge6}$ клеточной линии острого лимфобластного лейкоза человека 697-Luc2 с последующей инъекцией $10\times10^{\wedge6}$ сконструированных Т-клеток с различными редактированиями, чтобы определить, обеспечивают ли эти редактирования специфический противоопухолевый эффект. Группы изученных Т-клеток включают: контрольную группу Т-клеток без редактирования (только 697); Т-клетки с редактированиями в TRAC и TRBC (TCR KO); Т-клетки с редактированиями в TRAC и TRBC и вставкой HD1 (вставка TCR KO/WT1); Т-клетки с редактированиями в TRAC и TRBC, вставкой HD1 и нарушением в HLA-A (HLA-A KO); Т-клетки с редактированиями в TRAC и TRBC, вставкой HD1 и редактированиями в HLA-A и CIITA (AlloWT1); и Т-клетки с редактированиями в TRAC и TRBC и вставкой HD1 в присутствии соединения ДНК PKi, а также редактированиями в HLA-A и CIITA (AlloWT1+PKi, Соединение 1).

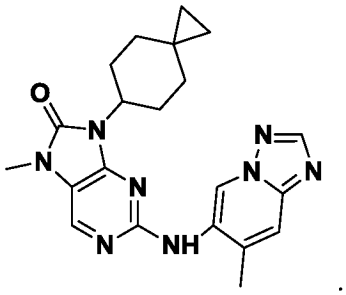
15.1. Подготовка Т-клеток

[00492] Т-клетки от донора HLA-A2+ (110046967) выделяли из продуктов лейкофереза здорового донора (STEMCELL Technologies). Т-клетки выделяли с помощью набора для выделения Т-клеток человека EasySep (STEMCELL Technologies, кат. № 17951) в соответствии с протоколом производителя и криоконсервировали с помощью Cryostor CS10 (STEMCELL Technologies, кат. № 07930). За день до начала редактирования Т-клеток, клетки размораживали и оставляли на ночь в среде для активации Т-клеток TCAM: CTS OpTmizer (Thermofisher #A3705001) с добавлением 2,5% сыворотки человека AB (Gemini #100-512), 1X GlutaMAX (Thermofisher #35050061), 10 мМ HEPES (Thermofisher #15630080), 200 Ед/мл IL-2 (Peprotech #200-02), IL-7 (Peprotech #200-07), IL-15 (Peprotech #200-15).

15.2. Множественное редактирование Т-клеток с последовательной доставкой LNP

[00493] Т-клетки готовили путем последовательной обработки клеток здорового донора четырьмя композициями LNP, составленными совместно с мРНК Cas9 и онРНК, нацеленными на TRAC, TRBC, CIITA и HLA-A. Липидная часть композиций LNP

включала липид A, холестерин, DSPC и PEG2k-DMG в молярном соотношении 50:38,5:10:1,5 соответственно. Составные композиции липида и нуклеиновой кислоты составляли с молярным соотношением амина липида к фосфату РНК (N:P) около 6 и соотношением нРНК к мРНК 1:2 по массе. Трансгенный TCR, нацеленный на WT1, сайт специфически интегрировали в сайт разреза TRAC с помощью шаблона гомологически-направленной репарации с применением AAV, указанных в **Таблице 30**, в сочетании с низкомолекулярным ингибиторома ДНК-зависимой протеинкиназы для увеличения скорости вставки tgTCR. Ингибитор, именуемый в дальнейшем «Соединение 1 DNAPKI», представляет собой 9-(4,4-дифторциклогексил)-7-метил-2-((7-метил-[1,2,4]триазоло[1,5-a] пиридин-6-ил)амино)-7,9-дигидро-8H-пурин-8-он, также обозначаемый как:



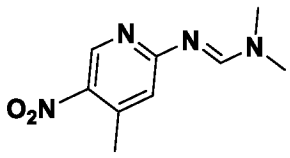
[00494] DNAPKI Соединение 1 готовили следующим образом:

Общая информация

[00495] Все реагенты и растворители были закуплены и применялись в том виде, в каком они были получены от коммерческих поставщиков, или синтезировалсь в соответствии с указанными процедурами. Все промежуточные соединения и конечные соединения очищали посредством колоночной флэш-хроматографии на силикагеле. Спектры ЯМР регистрировали на спектрометре Bruker или Varian 400 МГц, а данные ЯМР регистрировали в CDCl3 при температуре окружающей среды. Химические сдвиги указаны в миллионных долях (ppm) относительно CDCl3 (7.26). Данные для 1H ЯМР представлены следующим образом: химический сдвиг, мультиплетность (br=широкий, s=синглет, d=дублет, t=триплет, q=квартет, dd=дублет дублетов, dt=дублет триплетов, m=мультиплет), константа связывания и интегрирование. Данные MS регистрировали на масс-спектрометре Waters SQD2 с источником ионизации электрораспылением (ESI). Чистоту конечных соединений определяли с помощью UPLC-MS-ELS с применением прибора для жидкостной хроматографии Waters Acquity H-Class, оснащенного масс-спектрометром SQD2 с детекторами фотодиодной матрицы (PDA) и испарительного светорассеяния (ELS).

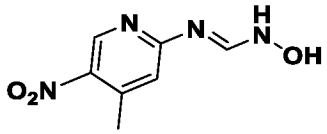
[00496] Пример 1 - Соединение 1

Промежуточное соединение 1a: (E)-N, N-диметил-N'-(4-метил-5-нитропиридин-2-ил)формимидамид



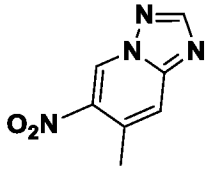
[00497] К раствору 4-метил-5-нитропиридин-2-амина (5 г, 1,0 экв.) в толуоле (0,3 М) добавляли DMF-DMA (3,0 экв.). Смесь перемешивали при 110°С в течение 2 часов. Реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении с получением остатка и очищали колоночной хроматографией с получением продукта в виде твердого вещества желтого цвета (59%). ^{1}H ЯМР (400 МГц, $(CD_3)_2SO$) δ 8,82 (s, 1H), 8,63 (s, 1H), 6,74 (s, 1H), 3,21 (m, 6H).

Промежуточное соединение 1b: (E)-N-гидрокси-N'-(4-метил-5-нитропиридин-2-ил)формимидамид



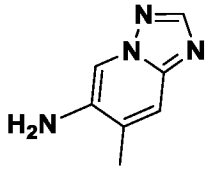
[00498] К раствору промежуточного соединения 1a (4 г, 1,0 экв.) в MeOH (0,2 М) добавляли $NH_2OH{\cdot}HCl$ (2,0 экв.). Реакционную смесь перемешивали при 80 °С в течение 1 часа. Реакционную смесь фильтровали и фильтрат концентрировали при пониженном давлении с получением остатка. Остаток распределяли между H_2O и EtOAc с последующей двукратной экстракцией EtOAc. Органические фазы концентрировали при пониженном давлении с получением остатка и очищали колоночной хроматографией с получением продукта в виде белого твердого вещества (66%). 1H ЯМР (400 МГц, $(CD_3)_2SO$) δ 10,52 (d, J=3,8 Гц, 1H), 10,08 (dd, J=9,9, 3,7 Гц, 1H), 8,84 (d, J=3,8 Гц, 1H), 7,85 (dd, J=9,7, 3,8 Гц, 1H), 7,01 (d, J=3,9 Hz, 1H), 3,36 (s, 3 H).

Промежуточное соединение 1c: 7-метил-6-нитро-[1,2,4]триазоло[1,5-a]пиридин



[00499] К раствору промежуточного соединения 1b (2,5 г, 1,0 экв.) в ТГФ (0,4 М) добавляли трифторуксусный ангидрид (1,0 экв.) при 0°С. Смесь перемешивали при 25 °С в течение 18 часов. Реакционную смесь фильтровали и фильтрат концентрировали при пониженном давлении с получением остатка. Остаток очищали колоночной хроматографией с получением продукта в виде белого твердого вещества (44%). ^{1}H ЯМР (400 МГц, $CDCl_3$) δ 9,53 (s, 1H), 8,49 (s, 1H), 7,69 (s, 1H), 2,78 (d, J=1,0 Гц, 3H).

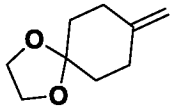
Промежуточное соединение 1d: 7-метил-[1,2,4]триазоло[1,5-a]пиридин-6-амин.



[00500] К смеси Pd/C (10% w/w, 0,2 экв.) в EtOH (0,1 М) добавляли промежуточное соединение 1c (1,0 экв. и формиат аммония (5,0 экв.). Смесь нагревали при 105°С в течение 2 часов. Реакционную смесь фильтровали и фильтрат концентрировали при пониженном давлении с получением остатка. Остаток очищали колоночной

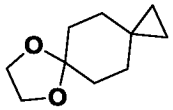
хроматографией с получением продукта в виде бледно-коричневого твердого вещества. ^{1}H ЯМР (400 МГц, $(CD_3)_2SO$) δ 8,41 (s, 2H), 8,07 (d, J=9,0 Гц, 2H), 7,43 (s, 1H), 2,22 (s, 3H).

Промежуточное соединение 1e: 8-метилен-1,4-диоксаспиро[4.5]декан.



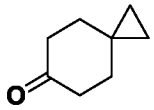
[00501] К раствору метил(трифенил)фосфония бромида (1,15 экв.) в ТГФ (0,6 М) по каплям добавляли н-BuLi (1,1 экв.) при -78 °С и смесь перемешивали при 0 °С в течение 1 ч. Затем к реакционной смеси добавляли 1,4-диоксаспиро[4.5]декан-8-он (50 г, 1,0 экв.). Смесь перемешивали при 25°С в течение 12 часов. Реакционную смесь выливали в водн. NH_4Cl при 0 °С, разбавляли H_2O и трижды экстрагировали с применением EtOAc. Объединенные органические слои концентрировали при пониженном давлении с получением остатка и очищали колоночной хроматографией с получением продукта в виде бесцветного масла (51%). ^{1}H ЯМР (400 МГц, $CDCl_3$) δ 4,67 (s, 1H), 3,96 (s, 4 H), 2,82 (t, J=6,4 Гц, 4 H), 1,70 (t, J=6,4 Гц, 4 H).

Промежуточное соединение 1f: 7,10-диоксадиспиро[2.2.4^6.2^3]додекан.



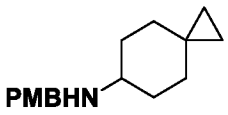
[00502] К раствору промежуточного соединения 4a (5 г, 1,0 экв.) в толуоле (3 М) по каплям добавляли $ZnEt_2$ (2,57 экв.) при -40 °С и смесь перемешивали при -40 °С в течение 1 часа. Затем к смеси по каплям добавляли дийодметан (6,0 экв.) при -40 °С в N_2. Затем смесь перемешивали при 20 °С в течение 17 ч в атмосфере N_2. Реакционную смесь выливали в водн. NH_4Cl при 0°С и дважды экстрагировали EtOAc. Объединенные органические фазы промывали соляным раствором (20 мл), сушили безводным Na_2SO_4, фильтровали и фильтрат концентрировали в вакууме. Остаток очищали колоночной хроматографией с получением продукта в виде бледно-желтого масла (73%).

Промежуточное соединение 1g: спиро[2,5]октан-6-он



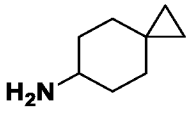
[00503] К раствору промежуточного соединения 4b (4 г, 1,0 экв.) в 1:1 THF/H_2O (1,0 М) добавляли TFA (3,0 экв.). Смесь перемешивали при 20 °С в течение 2 ч в атмосфере N_2. Реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении для удаления THF и pH остатка доводили до 7 с помощью 2 М NaOH (водн.). Смесь выливали в воду и трижды экстрагировали с применением EtOAc. Объединенную органическую фазу промывали соляным раствором, сушили безводным Na_2SO_4, фильтровали и фильтрат концентрировали в вакууме. Остаток очищали колоночной хроматографией с получением продукта в виде бледно-желтого масла (68%). ^{1}H ЯМР (400 МГц, $CDCl_3$) δ 2,35 (t, J=6,6 Гц, 4H), 1,62 (t, J=6,6 Гц, 4H), 0,42 (s, 4H).

Промежуточное соединение 1h: N-(4-метоксибензил)спиро[2,5]октан-6-амин



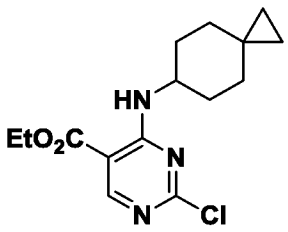
[00504] К смеси промежуточного соединения 4c (2 г, 1,0 экв.) и (4-метоксифенил)метанамина (1,1 экв.) в DCM (0,3 М) добавляли AcOH (1,3 экв.). Смесь перемешивали при 20°C в течение 1 ч в атмосфере N_2. Затем к смеси добавляли $NaBH(OAc)_3$ (3,3 экв.) при 0°C и смесь перемешивали при 20°C в течение 17 ч в атмосфере N_2. Реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении для удаления DCM, полученный остаток разбавляли H_2O и экстрагировали 3x EtOAc. Объединенные органические слои промывали солевым раствором, сушили над Na_2SO_4, фильтровали и фильтрат концентрировали при пониженном давлении с получением остатка. Остаток очищали колоночной хроматографией с получением продукта в виде серого твердого вещества (51%). ^{1}H ЯМР (400 МГц, $(CD_3)_2SO$) δ 7,15-7,07 (m, 2H), 6,77-6,68 (m, 2H), 3,58 (s, 3H), 3,54 (s, 2H), 2,30 (ddt, J=10,1, 7,3, 3,7 Гц, 1H), 1,69-1,62 (m, 2H), 1,37 (td, J=12,6, 3,5 Гц, 2H), 1,12-1,02 (m, 2H), 0,87-0,78 (m, 2H) , 0,13-0,04 (m, 2H).

Промежуточное соединение 1i: спиро[2.5]октан-6-амин



[00505] К суспензии Pd/C (10% w/w, 1,0 экв.) в MeOH (0,25 М) добавляли промежуточное соединение 4d (2 г, 1,0 экв.) и смесь перемешивали при 80 °C при 50 Psi в течение 24 ч в атмосфере H_2. Реакционную смесь фильтровали и фильтрат концентрировали при пониженном давлении с получением остатка, который очищали колоночной хроматографией с получением продукта в виде белого твердого вещества. ^{1}H ЯМР (400 МГц, $(CD_3)_2SO$) δ 2,61 (tt, J=10,8, 3,9 Hz, 1H), 1,63 (ddd, J=9,6, 5,1, 2,2 Гц, 2H), 1,47 (td, J=12,8, 3,5 Гц, 2H), 1,21-1,06 (m, 2H), 0,82-0,72 (m, 2H), 0,14-0,05 (m, 2H).

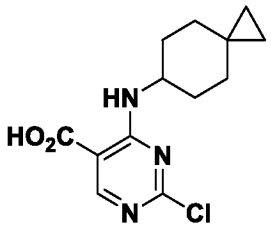
Промежуточное соединение 1j: этил 2-хлор-4-(спиро[2.5]октан-6-иламино)пиримидин-5-карбоксилат.



[00506] К смеси этил 2,4-дихлорпиримидин-5-карбоксилата (2,7 г, 1,0 экв.) и промежуточного соединения 1i (1,0 экв.) в ACN (0,5-0,6 М) добавляли K_2CO_3 (2,5 экв.) одной порцией в атмосфере N_2. Смесь перемешивали при 20 °C в течение 12 часов. Реакционную смесь фильтровали и фильтрат концентрировали при пониженном давлении с получением остатка. Остаток очищали колоночной хроматографией с получением продукта в виде белого твердого вещества (54%). ^{1}H ЯМР (400 МГц, $(CD_3)_2SO$) δ 8,64 (s, 1H), 8,41 (d, J=7,9 Гц, 1H), 4,33 (q, J=7,1 Гц, 2H), 4,08 (d, J=9,8 Гц, 1H), 1,90 (dd, J=12,7, 4,8

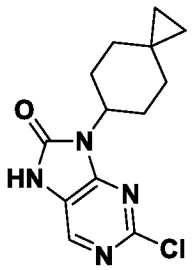
Гц, 2H), 1,64 (t, J=12,3 Гц, 2H), 1,52 (q, J=10,7, 9,1 Гц, 2H), 1,33 (t, J=7,1 Гц, 3H), 1,12 (d, J=13,0 Гц, 2H), 0,40-0,21 (m, 4H).

Промежуточное соединение 1k: 2-хлор-4-(спиро[2.5]октан-6-иламино)пиримидин-5-карбоновая кислота



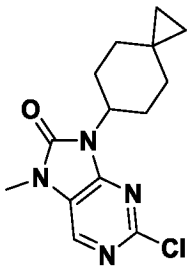
[00507] К раствору промежуточного соединения 1j (2 г, 1,0 экв.) в 1:1 THF/H_2O (0,3 M) добавляли LiOH (2,0 экв.). Смесь перемешивали при 20 °C в течение 12 часов. Реакционную смесь фильтровали и фильтрат концентрировали при пониженном давлении с получением остатка. Остаток доводили до pH 2 с применением 2 M HCl, осадок собирали фильтрованием, промывали водой и тестировали в вакууме. Продукт использовали непосредственно на следующей стадии без дополнительной очистки (82%). ^{1}H ЯМР (400 МГц, $(CD_3)_2SO$) δ 13,54 (s, 1H), 8,38 (d, J=8,0 Гц, 1H), 8,35 (s, 1H), 3,82 (qt, J=8,2, 3,7 Гц, 1H), 1,66 (dq, J=12,8, 4,1 Гц, 2H), 1,47-1,34 (m, 2H), 1,33-1,20 (m, 2H), 0,86 (dt, J=13,6, 4,2 Гц, 2H), 0,08 (dd, J=8,3, 4,8 Гц, 4H).

Промежуточное соединение 1l: 2-хлор-9-(спиро[2.5]октан-6-ил)-7,9-дигидро-8H-пурин-8-он



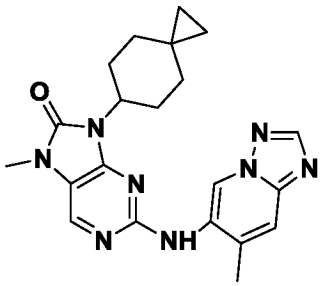
[00508] К смеси промежуточного соединения 1k (1,5 г, 1,0 экв.) и Et_3N (1,0 экв.) в DMF (0,3 M) добавляли DPPA (1,0 экв.). Смесь перемешивали при 120 °C в течение 8 ч в атмосфере N_2. Реакционную смесь выливали в воду. Осадок собирали фильтрованием, промывали водой и сушили в вакууме, получая остаток, который использовали непосредственно на следующей стадии без дополнительной очистки (67%). ^{1}H ЯМР (400 МГц, $(CD_3)_2SO$) δ 11,68 (s, 1H), 8,18 (s, 1H), 4,26 (ddt, J=12,3, 7,5, 3,7 Гц, 1H), 2,42 (qd, J=12,6, 3,7 Гц, 2H), 1,95 (td, J=13,3, 3,5 Гц, 2H), 1,82-1,69 (m, 2H), 1,08-0,95 (m, 2H), 0,39 (tdq, J=11,6, 8,7, 4,2, 3,5 Гц, 4H).

Промежуточное соединение 1m: 2-хлор-7-метил-9-(спиро[2.5]октан-6-ил)-7,9-дигидро-8H-пурин-8-он



[00509] К смеси промежуточного соединения 1l (1,0 г, 1,0 экв.) и NaOH (5,0 экв.) в 1:1 THF/H_2O (0,3-0,5 М) добавляли MeI (2,0 экв.). Смесь перемешивали при 20°C в течение 12 ч в атмосфере N_2. Реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении с получением остатка, который очищали колоночной хроматографией с получением продукта в виде бледно-желтого твердого вещества (67%). ^{1}H ЯМР (400 МГц, $CDCl_3$) δ 7,57 (s, 1H), 4,03 (tt, J=12,5, 3,9 Гц, 1H), 3,03 (s, 3H), 2,17 (qd, J=12,6, 3,8 Гц, 2H), 1,60 (td, J=13,4, 3,6 Гц, 2H), 1,47-1,34 (m, 2H), 1,07 (s, 1H), 0,63 (dp, J=14,0, 2,5 Гц, 2H), -0,05 (s, 4H).

Соединение 1: 7-метил-2-((7-метил-[1,2,4]триазоло[1,5-a]пиридин-6-ил)амино)-9-(спиро[2.5]октан-6-ил)-7,9-дигидро-8H-пурин-8-он



[00510] Смесь Промежуточного соединения 1m (1,0 экв.) и Промежуточного соединения 1d (1,0 экв.), Pd(dppf)Cl_2 (0,2 экв.), XantPhos (0,4 экв.) и Cs_2CO_3 (2,0 экв.) в DMF (0,2-0,3 М) дегазировали и продували 3 раза N_2, и указанную смесь перемешивали при 130°C в течение 12 часов в атмосфере N_2. Затем смесь выливали в воду и трижды экстрагировали с применением DCM. Объединенную органическую фазу промывали соляным раствором, сушили над Na_2SO_4, фильтровали и фильтрат концентрировали в вакууме. Остаток очищали колоночной хроматографией с получением продукта в виде грязно-белого твердого вещества. ^{1}H ЯМР (400 МГц, $(CD_3)_2SO$) δ 9,09 (s, 1H), 8,73 (s, 1H), 8,44 (s, 1H), 8,16 (s, 1H), 7,78 (s, 1H), 4,21 (t , J=12,5 Гц, 1H), 3,36 (s, 3H), 2,43 (s, 3H), 2,34 (dt, J=13,0, 6,5 Гц, 2H), 1,93-1,77 (m, 2H), 1,77-1,62 (m, 2H), 0,91 (d, J=13,2 Гц, 2H), 0,31 (t, J=7,1 Гц, 2H). МС: 405,5 m/z [M+H].

[00511] Последовательное редактирование происходило для каждой группы, как продемонстрировано в **Таблице 30**.

[00512] **Таблица 30 Конструирование Т-клеток**

Название группы	День 1	День 2	День 3	День 4
TCR KO	TRBC		TRAC	
Вставка TCR	TRBC		TRAC/AAV	

KO/WT1				
WT1/HLA-A		HLA-A	TRAC/AAV	TRBC
AlloWT1	CIITA	HLA-A	TRAC/AAV	TRBC
AlloWT1+ДНК PKi Соединение 1	CIITA	HLA-A	TRAC/AAV +Соединение 1 (0,25 мкМ)	TRBC

15.3. Лечение LNP и размножение Т-клеток

[00513] Композиции LNP готовили в среде, содержащей ApoE, и доставляли в Т-клетки следующим образом: в день 1 композиции LNP, указанные в **Таблице 30**, инкубировали при концентрации 5 мкг/мл в TCAM, содержащей 5 мкг/мл rhApoE3 (Peprotech 350-02). Тем временем Т-клетки собирали, промывали и ресуспендировали при плотности $2\times10^{\wedge6}$ клеток/мл в TCAM с разведением 1:50 реагента человека T Cell TransAct (Miltenyi, 130-111-160). Т-клетки и среду LNP-ApoE смешивали в соотношении 1:1 и Т-клетки высевали в культуральные флаконы на ночь.

[00514] В день 2 композиции LNP, как указано в **Таблице 30**, инкубировали в концентрации 25 мкг/мл в TCAM, содержащей 20 мкг/мл rhApoE3 (Peprotech, 350-02). Затем к соответствующей культуре добавляли раствор LNP-ApoE в соотношении 1:10.

[00515] В день 3 композиции TRAC-LNP (**Таблица 30**), инкубировали в концентрации 5 мкг/мл в TCAM, содержащей 10 мкг/мл rhApoE3 (Peprotech, 350-02). Тем временем Т-клетки собирали, промывали и ресуспендировали при плотности $1\times10^{\wedge6}$ клеток/мл в TCAM. Т-клетки и среду LNP-ApoE смешивали в соотношении 1:1 и Т-клетки высевали в культуральные флаконы. Затем к соответствующим группам добавляли AAV WT1 при множественности заражения $3\times10^{\wedge5}$ GC/клетку. Соединение 1 добавляли к соответствующим группам в конечной концентрации 0,25 uM.

[00516] В день 4 композиции LNP, как указано в **Таблице 30**, инкубировали в концентрации 5 мкг/мл в TCAM, содержащей 5 мкг/мл rhApoE3 (Peprotech, 350-02). Т-клетки промывали центрифугированием и ресуспендировали при плотности $1\times10^{\wedge6}$ клеток/мл. Затем к соответствующим культурам добавляли раствор LNP-ApoE в соотношении 1:1.

[00517] С 5 по 11 день Т-клетки переносили на планшет GREX (Wilson Wolf) в среде для размножения Т-клеток (TCEM: CTS OpTmizer (Thermofisher № A3705001) с добавлением 5% Immune Cell Serum Replacement CTS (Thermofisher № A2596101), 1X GlutaMAX (Thermofisher № 35050061), 10 мМ HEPES (Thermofisher № 15630080), 200 ЕД/мл IL-2 (Peprotech № 200-02), IL-7 (Peprotech № 200-07), IL-15 (Peprotech № 200-15) и размножали. Вкратце, Т-клетки размножали в течение 6 дней с добавлением свежих цитокинов через день. Клетки подсчитывали с применением счетчика клеток Vi-CELL (Beckman Coulter) и рассчитывали кратность путем деления выхода клеток на исходный материал.

15.4. Количественная оценка редактирования Т-клеток с помощью проточной

цитометрии и NGS

[00518] После размножения отредактированные Т-клетки окрашивали в коктейле антител для определения нокаута HLA-A2 (HLA-A2$^-$), нокдауна HLA-DR-DP-DQ посредством нокаута CIITA (HLA-DRDPDQ$^-$), вставки WT1-TCR (CD3$^+$Vb8$^+$), и процента клеток, экспрессирующих остаточный эндогенный (CD3$^+$Vb8$^-$). Затем клетки промывали, анализировали на приборе Cytoflex LX (Beckman Coulter) с помощью пакета программ FlowJo. Т-клетки были отобраны по размеру и статусу CD8+, прежде чем были определены скорости редактирования и вставки. Скорость редактирования и вставки можно найти в **Таблице 31** и на **Фигурах 14A-14F**. Процент полностью отредактированных клеток AlloWT1-T, экспрессирующих WT1-TCR с нокаутом HLA-A и CIITA, определяли как % CD3$^+$Vb8$^+$HLA-A$^-$HLA-DRDPDQ$^-$. В отредактированных образцах наблюдались высокие уровни нокаута HLA-A и CIITA, а также вставки WT1-TCR и эндогенного TCR KO. Примечательно, что Т-клетки, получавшие ингибитор PK ДНК, Соединение 1, продемонстрировали улучшенную эффективность редактирования..

[00519] Визуализацию IVIS живых мышей проводили для идентификации люциферазоположительных опухолевых клеток по спектру IVIS. Визуализацию IVIS выполняли через 2 дня, 6 дней, 9 дней, 13 дней, 16 дней и 18 дней после инъекции Т-клеток. Мышей готовили к визуализации с помощью инъекции D-люциферина внутрибрюшинно в дозе 10 мкг/г массы тела в соответствии с рекомендацией производителя, около 150 мкл на животное. Животных анестезировали, а затем помещали в блок визуализации IVIS. Визуализацию выполняли с автоматически установленным временем экспозиции, полем зрения D, средним биннингом и значением F/stop равным 1. В **Таблице 32** и на **Фигуре 15** продемонстрирована яркость (фотоны/с/см2/sr) экспрессирующих люциферазу Т-клеток, присутствующих в различные моменты времени после инъекции вплоть до 18 дней.

[00520] **Таблица 31 - Эффективность редактирования Т-клеток**

	CD8+	Эндогенный TCR+	WT1 TCR+	HLA-A2-	HLA-DRDPDQ-	AlloWT1+
Неотредактированные	26,9	95,4	4,39	0,66	35,7	0,00292
TCR KO	31,1	5,12	0,5	0,62	30,8	0,23
WT1	34,2	1,2	78,5	0,47	49,7	0,03
WT1/HLA-A	24,8	0,93	63,3	99,1	56,4	40,5
AlloWT1	28,8	0,51	69,3	98,7	96,2	66,1
AlloWT1+Соединение 1	29,2	0,23	89,8	99	96,5	86

[00521] **Таблица 32 - Общий поток (фотонов/с) от целевых клеток, экспрессирующих люциферазу, у обработанных мышей с интервалами после**

инъекции Т-клеток.

		Среднее	**SD**	**n**
IR Контроль	2	668000	0	1
	6	662000	0	1
	9	802000	0	1
	13	834000	0	1
	16	799000	0	1
	18	727000	0	1
Только 697	2	11695000	6766940,65	8
	6	11756250	6759771,63	8
	9	6542375000	4097940177	8
	13	34156125000	19588932739	8
	16	56000000000	14890936841	8
	18			
TCR KO	2	8696250	3615004,20	8
	6	8755000	3659211,47	8
	9	1985750000	1311102671	8
	13	39295000000	18556359711	8
	16	50442857143	12082474518	7
	18	35000000000	0	1
Вставка TCR KO/WT1	2	1395750	651356,99	8
	6	1418625	660585,66	8
	9	13293750	10040193,42	8
	13	416762500	340405656,90	8
	16	987625000	637380114,80	8
	18	2523750000	1518542699	8
HLA-A KO	2	1306375	514478,92	8
	6	1323750	504219,55	8
	9	1785000	691416,77	8
	13	9851428,57	13794971,82	7
	16	35832857,14	53937852,11	7
	18	53608571,43	65167479,22	7
AlloWT1	2	1085625	137185,94	8
	6	1100250	136031,25	8

		Среднее	**SD**	**n**
	9	12085000	20455051,77	8
	13	43676250	87426018,67	8
	16	146917500	310795920,60	8
	18	31418750	33596200,65	8
AlloWT1+ДНКРki	2	1138000	429877,06	8
	6	1152750	420860,26	8
	9	1720000	654391,77	8
	13	3976250	5828721,83	8
	16	39420000	97704137,36	8
	18	80597500	162813409,10	8

15.5. Высвобождение цитокинов сконструированными Т-клетками

[00522] Сконструированные Т-клетки, приготовленные, как описано в Примерах 10.1 и 10.2, анализировали на их профили высвобождения цитокинов. Анализы уничтожения опухолевых клеток in vitro OCI-AML3 проводили отдельно (данные не продемонстрированы) с применением сконструированных Т-клеток. Супернатанты из анализов уничтожения опухолевых клеток применяли для оценки профиля выделения цитокинов каждой сконструированной Т-клеткой.

[00523] Вкратце, Т-клетки TCR KO, аутологичные Т-клетки WT1 (TCR KO+вставка TCR WT1) и аллогенные Т-клетки WT1 (как указано в **Таблице 33**) размораживали и оставляли на ночь в TCGM с добавлением IL-2, IL-7 и IL-15. На следующий день проводили анализ совместного культивирования, в котором каждую группу сконструированных Т-клеток культивировали совместно с целевой опухолью OCI-AML3. Сначала опухолевые клетки-мишени OCI-AML3 обрабатывали пептидом VLD в различных концентрациях (500, 50, 5, 0,5, 0,05 и 0,005 нМ) в течение 1 часа. Затем Т-клетки из каждой группы подсчитывали и ресуспендировали в среде TCGM без цитокинов и совместно культивировали с импульсным OCI-AML3 при соотношении E:T 1:1. Количество Т-клеток при совместном культивировании нормализовали по показателю встраивания, чтобы сохранить согласованность E:T среди разных групп. После 24 часов совместного культивирования надосадочную жидкость из каждого образца совместного культивирования разбавляли в 5 раз Разбавителем 2 из набора для анализа U-PLEX Immuno-Oncology Group 1 (hu) (MSD, кат. № K151AEL-2). 50 мкл разведенных образцов из каждой группы загружали в планшет meso scale discovery (MSD) и инкубировали в течение 1 часа.

[00524] **Таблица 33 - Конструирование Т-клеток.**

	CD8+	Эндогенный TCR+	WT1 TCR+	HLA-A2-	HLA-DRDPDQ-	AlloWT1+

Неотредактированные	26,9	95,4	4,39	0,66	35,7	0,00292
TCR KO	31,1	5,12	0,5	0,62	30,8	0,23
WT1	34,2	1,2	78,5	0,47	49,7	0,03
WT1/HLA-A	24,8	0,93	63,3	99,1	56,4	40,5
AlloWT1	28,8	0,51	69,3	98,7	96,2	66,1
AlloWT1+ Соединение 1	29,2	0,23	89,8	99	96,5	86

[00525] Для каждого из измеренных цитокинов к назначенному линкеру в соответствии с протоколом набора добавляли биотинилированное захватывающее антитело из иммуноонкологических анализов U-PLEX группы 1 (hu) Assays (MSD, кат. № K151AEL-2). Смеси антитело-линкер встряхивали и инкубировали при комнатной температуре в течение 30 минут. После инкубации планшет промывали, запечатывали и оставляли на ночь.

[00526] На следующий день калибраторы, содержащие стандарты для каждого из анализируемых цитокинов (IL-2 и IFN-γ), восстанавливали в соответствии с инструкциями производителя и разводили для получения 4-кратной стандартной кривой.

[00527] Планшеты промывали и добавляли по 50 мкл раствора детектирующих антител (приготовленного в соответствии с инструкциями к набору) в каждую лунку планшета MSD. Планшет инкубировали в течение 1 часа.

[00528] После инкубации планшет промывали и сразу считывали на приборе MSD. Выделение цитокинов продемонстрировано в **Таблицах 34-35** и на **Фиг. 16A-16B**.

[00529] **Таблица 34. IFN-γ**

IFN-γ						
Log[пептид (нМ)]	TCR KO		AutoWT1		AlloWT1	
2,70	122,55	25,96	93417,51	7094,06	147620,65	9709,50
1,70	134,20	16,97	60680,24	2770,37	104018,15	10358,48
0,70	144,94	24,90	41863,52	1759,74	99896,25	7700,60
-0,30	146,14	58,09	4812,67	175,51	31820,97	1331,50
-1,30	155,20	11,49	77,72	23,65	1592,76	131,04
-2,30	110,63	22,03	69,41	3,27	351,29	23,17

[00530] **Таблица 35. IL-2**

IL-2			
Log[пептид (нМ)]	TCR KO	AutoWT1	AlloWT1

IL-2						
2,70	4,21	0,63	6031,67	373,56	7525,26	1116,85
1,70	4,17	0,76	3419,94	97,86	4450,71	861,82
0,70	5,28	0,25	1882,55	204,86	3780,66	381,75
-0,30	6,62	2,96	69,51	6,86	452,94	20,13
-1,30	5,87	1,47	4,88	1,07	10,91	2,80
-2,30	6,55	2,18	5,19	1,32	4,94	2,17

Пример 16: Т-клетки HLA-A+CIITA DKO не вызывают пролиферацию CD4 или CD8 хозяина в анализе смешанной реакции лимфоцитов

[00531] Т-клетки выделяли из периферической крови здорового донора-человека со следующим фенотипом MHC I: HLA-A*02:01:01G, 03:01:01G, HLA-B*07:02:01G, HLA-C*07:02:01G. Вкратце, лейкаферезный пакет (Stemcell Technologies) обрабатывали буфером для лизиса эритроцитов с хлоридом аммония (Stemcell Technologies; кат. № 07800) в течение 15 минут для лизиса эритроцитов. Количество мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC) определяли после лизиса а выделение Т-клеток осуществляли с применением набора для выделения Т-клеток человека EasySep (Stemcell Technologies, кат. № 17951) согласно протоколу производителя. Выделенные CD3+ Т-клетки ресуспендировали в среде Cryostor CS10 (Stemcell Technologies, кат. 07930) и замораживали в жидком азоте до дальнейшего применения.

[00532] Замороженные Т-клетки оттаивали при концентрации клеток $1,5\times10^{\wedge6}$ клеток/мл в среде для активации Т-клеток (TCAM), состоящей из OpTmizer TCGM, как описано в Примере 3, с дополнительным добавлением 100 Ед/мл рекомбинантного интерлейкина-2 человека (Peprotech, кат. 200-02), 5 нг/мл IL-7 (Peprotech, кат. 200-07), 5 нг/мл IL-15 (Peprotech, кат. 200-15). Клетки выдерживали при 37 °C в течение 24 часов.

[00533] Через 24 часа после оттаивания Т-клетки подсчитывали и ресуспендировали в концентрации $2\times10^{\wedge6}$ клеток/мл в среде TCAM и добавляли 1:50 по объему TransAct (Miltenyi Biotec кат. 30-111-160). В каждую лунку 24-луночного планшета для тканевых культур добавляли $1\times10^{\wedge6}$ клеток, оставляя по 2 лунки для каждой группы, которую нужно сконструировать, и 2 лунки в качестве неотредактированных контролей (сконструированные группы: Неотредактированные или WT, B2M KO (также обозначается как HLA-I или HLA класс I), CIITA (также обозначается как HLA класс II или HLA-II) KO, B2M+CIITA DKO, HLA-A KO, HLA-A+CIITA DKO). Планшет переносили в инкубатор при 37 °C. Композиции LNP, содержащие мРНК, кодирующую cas9 (SEQ ID NO:802), и онРНК G013675 (SEQ ID NO: 27), нацеленные на CIITA, были составлены с липидом A, холестерином, DSPC и PEG2k-DMG в молярном соотношении 50:38,5:10:1,5 соответственно. Составные композиции липида и нуклеиновой кислоты составляли с молярным соотношением амина липида к фосфату РНК (N:P) около 6 и соотношением нРНК к мРНК 1:2 по массе. Композиции LNP в концентрации 5 мкг/мл инкубировали в OpTmizer TCAM с дополнительным добавлением 5 мкг/мл

рекомбинантного ApoE3 человека (Peprotech, Cat. 350-02) в течение 15 минут при 37 °C. В 6 из 12 лунок, предварительно инкубированные LNP и Т-клетки с Transact смешивали для получения конечных концентраций 1×10^6 Т-клеток/мл и 2,5 мкг общей РНК/мл LNP в среде TCAM с 2,5% сыворотки АВ человека, 100 Ед/мл рекомбинантного интерлейкина-2 человека (Peprotech, кат. № 200-02), 5 нг/мл IL-7 (Peprotech, кат. 200-07), 5 нг/мл IL-15 (Peprotech, кат. 200-15) (2 лунки для группы CIITA KO, 2 лунки для группы HLA-A+CIITA DKO и 2 лунки для группы B2M+CIITA DKO). Все дополнительные лунки редактировали имитационно с применением среды, содержащей ApoE3, но без композиций LNP. Все клетки инкубировали при 37°C в течение 24 часов.

[00534] Через 24 часа после активации, 2 ранее необработанные лунки и 2 лунки, содержащие CIITA LNP, обрабатывали композициями LNP для B2M (для групп B2M KO и B2M+CIITA DKO); и 2 ранее необработанные лунки и 2 лунки, содержащие CIITA LNP, обрабатывали композициями LNP для HLA-A (для групп HLA-A KO и HLA-A+CIITA DKO). Композиции LNP, содержащие мРНК Cas9 и онРНК G000529 (SEQ ID NO: 216), нацеленные на B2M, и композиции LNP, содержащие мРНК, кодирующую cas9 (SEQ ID NO:802), и онРНК G018995 (онРНК, содержащая SEQ ID NO: 214, как показано в таблице 4), нацеленные на HLA-A, составляли с липидом A, холестерином 1, DSPC и PEG2k-DMG в молярном соотношении 50:38,5:10:1,5 соответственно. Составные композиции липида и нуклеиновой кислоты составляли с молярным соотношением амина липида к фосфату РНК (N:P) около 6 и соотношением нРНК к мРНК 1:2 по массе. Композиции LNP в концентрации 25мкг/мл инкубировали в OpTmizer TCAM с дополнительным добавлением 20мкг/мл рекомбинантного ApoE3 человека (Peprotech, кат. № 350-02) в теяение15 минут при 37 °C. Композиции LNP B2M и HLA-A добавляли в соответствующие лунки 24-луночного планшета, как указано выше, с получением конечных концентраций 2,5 мкг общей РНК/мл LNP в среде TCAM с 2,5% сыворотки АВ человека, 100 Ед/мл рекомбинантного интерлейкина-2 человека (Peprotech, кат. 200-02), 5 нг/мл IL-7 (Peprotech, кат. 200-07), 5 нг/мл IL-15 (Peprotech, кат. 200-15). Дополнительную группу клеток редактировали имитационно с применением среды, содержащей ApoE3, но без композиций LNP, для применения в качестве неотредактированного или WT-контроля. Все клетки инкубировали при 37°C в течение 24 часов.

[00535] Через 24 часа после второго цикла редактирования клетки промывали вращением при 500xG в течение 5 минут и ресуспендировали в среде TCEM, содержащей 5% CTS™ Immune Cell SR (Gibco кат. A2596101), 100 ЕД/мл рекомбинантного человеческого интерлейкина-2 (Peprotech, кат. 200-02), 5 нг/мл IL-7 (Peprotech, кат. 200-07), 5 нг/мл IL-15 (Peprotech, кат. 200-15. Клетки культивировали и выдерживали в чашке G-Rex в течение 7 дней с регулярной сменой среды и цитокинов, после чего ресуспендировали в среде Cryostor CS10 (Stemcell Technologies, кат. 07930) и замораживали в жидком азоте до дальнейшего применения.

[00536] Для анализа MLR шесть групп донорных Т-клеток (неотредактированные дикого типа, B2M KO, HLA-A KO, CIITA KO, HLA-A+CIITA DKO, B2M+CIITA DKO)

размораживали и ресуспендировали в TCGM в концентрации 1×10^6/мл+100 ЕД/мл IL-2, 0,5 нг/мл IL-7 и IL-15 (HLA-генотипы донора и хозяина продемонстрированы ниже в **Таблице 36**). Мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC) от 3 хозяев (аутологичный хозяин, аллогенный хозяин (хозяин, совпадающий с (HLA-B и C) и хозяин с положительным контролем (HLA-A, HLA-B и HLA-C несовместимы) размораживали, ресуспендировали в TCGM при 1×10^6/мл+100 ЕД/мл IL-2, 0,5 нг/мл IL-7 и IL-15. Клетки донора и хозяина выдерживали в течение ночи в инкубаторе при 37 ^{0} C. На следующий день флаконы с донорными клетками облучали при 4000 rad и центрифугировали, и каждую группу ресуспендировали при 1×10^6/мл в TCGM без цитокинов. PBMC хозяина от двух хозяев удаляли из $CD56^{+}$ клеток с применением CD56 MicroBeads (Miltenyi Biotec, кат. № 130-050-401). Около 1×10^6 клеток от каждого хозяина сохраняли в пробирках объемом 15 мл для немеченых контролей потока. Чтобы пометить 18×10^6 клеток каждого хозяина, флакон Cell Trace Violet (Thermo Fisher, кат. № C34571) доводили до комнатной температуры и восстанавливали с использованием 20 мкл DMSO для получения исходного раствора 5 мМ CTV. Клетки-хозяева ресуспендировали в концентрации ~1×10^6/мл в забуференном фосфатом солевом растворе (Corning, кат. № 21-040-CV) и переносили в другую коническую пробирку на 50 мл. После добавления 18 мкл CTV в пробирки для окрашивания клеток-хозяев пробирки переносили в инкубатор при 37°C на 15 минут. После этого пробирки заполняли до 40 мл TCGM без цитокинов для поглощения любого несвязанного красителя. Затем меченые клетки-хозяева центрифугировали при 500×g в течение 5 минут и ресуспендировали в TCGM без цитокинов при 1×10^6/мл. 50 000 клеток на 50 мкл на лунку PBMC-хозяина высевали на лунку от соответствующих хозяев. В лунки, требующие 4х клеток-хозяев (контрольные образцы для нормализации данных), высевали 200 000 клеток-хозяев по 200 мкл на лунку. В клетки-хозяева, помеченные как «хозяин+TransAct» (положительный контроль пролиферации), высевали 50 000 клеток на 50 мкл на лунку PBMC-хозяина с последующим добавлением 1 мкл T Cell TransAct™ человека (Miltenyi Biotec, кат. № 130-111-160), а объем этих лунок доводили до 200 мкл безцитокиновым TCGM. Облученные донорные клетки высевали в соответствии со схемой планшета по 150 000 клеток на 150 мкл на лунку. Для контроля потока по 50 000 клеток от одного донора и хозяина помещали вместе. Объем во всех лунках заполняли до 200 мкл TCGM без цитокинов.

[00537] На день 5 после совместного культивирования половину среды (~100 мкл) из каждой лунки заменяли свежей средой (TCGM без цитокинов).

[00538] На день 8 после совместного культивирования планшет для анализа окрашивали и анализировали с помощью проточной цитометрии. Для окрашивания планшет центрифугировали при 600xg в течение 3 минут, встряхивали для удаления среды и добавляли по 100 мкл 1:100 об./об. раствора блокатора Fc (Biolegend, кат. № 422302) в буфер FACS в каждую лунку. Клетки ресуспендировали в блокаторе Fc и планшет инкубировали при комнатной температуре в течение 5 минут. Коктейль антител готовили таким образом, чтобы каждое антитело присутствовало в разведении 1:100 об./об., и 100

мкл этой смеси антител добавляли в каждую лунку к образцу. Планшет защищали от света, накрывая алюминиевой фольгой, и инкубировали при 2-8 ^{0} C в течение 20-30 минут. После окрашивания планшет центрифугировали при 600×g в течение 3 минут, встряхивали для удаления среды и промывали 200 мкл буфера FACS. Планшет снова промывали и клеточный осадок ресуспендировали в 70 мкл раствора 1:200 v/v красителя для определения жизнеспособности 7-AAD (BD Pharmingen, кат. № 51-68981E). Неокрашенные лунки ресуспендировали в 70 мкл буфера FACS. Планшет запускали в быстром режиме (60 секунд на лунку) на проточном цитометре Cytoflex. Результаты, показанные в **таблицах 37A и 37B и на Фиг. 13A и 13B** (на фигурах показаны подмножества данных для дикого типа, B2M KO и HLA-A+CIITA DKO), демонстрируют, что клетки HLA-A+CIITA DKO индуцируют минимальные ответы CD4 и CD8 у аллогенного хозяина (HLA-B и C совпадают), которые были сопоставимы с ответом, вызванным клетками B2M+CIITA DKO. Результаты для каждой группы были нормализованы к результатам пролиферации 4x группы хозяина для соответствующего хозяина.

[00539] **Таблица 36 - Генотипы доноров Т-клеток и хозяев PBMC**

	HLA-A	HLA-B	HLA-C	HLA-DR	HLA-DQ	HLA-DP
Донор Т-клеток и аутологичный хозяин	A*02:01:01G, 03:01:01G	B*07:02:01G	C*07:02:01G	DRB1*15:01:01G, DRB5*01:01:01G	DQA1*01:02:01G, DQB1*06:02:01G	DPA1*01:03:01G, 02:07:01G, DPB1*04:01:01G, 19:01:01G
Хозяин, совпадающий по B, C	A*02:01:01G	B*07:02:01G, 44:02:01G	C*05:01:01G, 07:02:01G	DRB1*13:01:01G, 15:01:01G, DRB3*01:01:02G, DRB5*01:01:01	DQB1*06:02:01G, 06:03:01G, DQA1*01:02:01G, 01:03:01G	DPB1*02:01:02G, 04:02:01G, DPA1*01:03:01G
HLA несовместимый хозяин	A*11:01:01G, 24:02:01G	B*40:01:01G	C*03:04:01G	DRB1*08:01:01G, 13:02:01G, DRB3*03:01:01G	DQB1*04:02:01G, 06:04:01G	DPB1*03:01:01G, 05:01:01G

[00540] **Таблица 37A - Пролиферация CD4+ Т-клеток хозяина**

Группа	Аутологичный хозяин		Аллогенный хозяин		Хозяин положительного контроля	
	Средний % нормализованной пролиферации	SD % нормализованной пролиферации	Средний % нормализованной пролиферации	SD % нормализованной пролиферации	Средний % нормализованной пролиферации	SD % нормализованной пролиферации
ДТ	-13,76	3,05	5,93	1,72	39,07	3,68
B2M KO	-13,50	2,66	-3,22	5,10	42,47	3,20
CIITA KO	-12,62	4,27	-7,00	5,54	-8,83	14,93
B2M+CIITA KO	-11,98	2,76	-5,15	5,21	-14,20	4,64
HLA-A KO	-9,14	7,96	7,67	12,41	41,83	5,01
HLA-A+CIITA KO	-11,33	2,03	-3,00	4,47	-3,97	6,57

[00541] **Таблица 37B- Пролиферация CD8+ Т-клеток хозяина**

Группа	Аутологичный хозяин		Аллогенный хозяин		Хозяин положительного контроля	
	Средний % нормализованной пролиферации	SD % нормализованной пролиферации	Средний % нормализованной пролиферации	SD % нормализованной пролиферации	Средний % нормализованной пролиферации	SD % нормализованной пролиферации
ДТ	7,53	6,95	35,71	12,28	74,00	1,42
B2M KO	-8,87	3,75	20,41	0,95	31,97	11,70
CIITA KO	1,43	5,24	6,17	4,89	56,07	8,53
B2M+CII	9,63	14,50	-0,05	4,59	0,47	5,23

TA KO						
HLA-A KO	22,40	23,65	25,31	16,59	71,83	2,25
HLA-A+CIITA KO	17,57	12,00	5,14	2,88	58,13	7,02

Пример 17: Последовательная доставка множества композиций LNP для множественных нарушений и вставок генов

[00542] Т-клетки были сконструированы с серией генных нарушений и вставок. Клетки от здорового донора обрабатывали последовательно четырьмя композициями LNP, при этом каждая композиция LNP содержала мРНК, кодирующую Cas9 (SEQ ID NO: 802) и онРНК, нацеленную на TRAC (G013006) (SEQ ID NO: 203), TRBC (G016239) (SEQ ID NO: 211), CIITA (G013675) (SEQ ID NO: 27) или HLA-A (G018995) (онРНК, содержащая SEQ ID NO: 214, как показано в Таблице 4). Композиции LNP составляли в соответствии с Группами, указанными в **Таблице 38**, либо с липидом A, холестерином, DSPC и PEG2k-DMG в молярном соотношении 35:47,5:15:2,5 (Группы 1 и 2), соответственно, либо с липидом A, холестерином, DSPC и PEG2k-DMG в молярном соотношении 50:35,5:10:1,5 (Группа 3) соответственно в указанных дозах. Группы 1 и 2 различаются по концентрации LNP. Составные композиции липида и нуклеиновой кислоты составляли с молярным соотношением амина липида к фосфату РНК (N:P) около 6 и соотношением нРНК к мРНК 1:2 по массе. Трансгенный WT1, нацеленный на TCR, был сайт-специфически интегрирован в сайт разреза TRAC путем доставки шаблона направленной гомологичной репарации с использованием AAV. Композиции LNP готовили каждый день и доставляли в Т-клетки, как описано в **Таблице 38.**

17.1. Подготовка Т-клеток

[00543] Т-клетки трех HLA-A*02:01+ серотипов выделяли из продуктов лейкофереза двух здоровых доноров (STEMCELL Technologies). Т-клетки выделяли с помощью набора для выделения Т-клеток человека EasySep (STEMCELL Technologies, кат. № 17951) в соответствии с протоколом производителя и криоконсервировали с помощью Cryostor CS10 (STEMCELL Technologies, кат. № 07930). За день до начала редактирования Т-клеток, клетки размораживали и оставляли на ночь в среде для активации Т-клеток (TCAM: CTS OpTmizer Thermofisher №A3705001) с добавлением 2,5% сыворотки АВ человека (Gemini №100-512), 1X GlutaMAX (Thermofisher №35050061), 10 мМ HEPES (Thermofisher №15630080), 200 Ед/мл IL-2 (Peprotech №200-02), IL-7 (Peprotech №200-07), и IL-15 (Peprotech №200-15).

17.2. Лечение LNP и размножение Т-клеток

[00544] Композиции LNP размораживали и разбавляли каждый день в среде, содержащей ApoE, и доставляли к Т-клеткам следующим образом.

[00545] **Таблица 38 - Порядок редактирования Т-клеточного конструирования**

Группа	**День 1 Редактирование (LNP состав и конечная концентрация)**	**День 2 Редактирование (LNP состав и конечная концентрация)**	**День 3 Редактирование (LNP состав и конечная концентрация)**	**День 4 Редактирование (LNP состав и конечная концентрация)**
Группа 1	CIITA KO (Липид A: 35, 47,5, 15, 2,5, 0,65 мкг/мл)	HLA-A KO (Липид A: 35, 47,5, 15, 2,5, 0,65 мкг/мл)	TRAC KI (Липид A: 35, 47,5, 15, 2,5, 0,65 мкг/мл)	TRBC KO (Липид A: 35, 47,5, 15, 2,5, 0,65 мкг/мл)
Группа 2	CIITA KO (Липид A: 35:47,5:15:2,5, 2,5 мкг/мл)	HLA-A KO (Липид A: 35:47,5:15:2,5, 2,5 мкг/мл)	TRAC KI (Липид A: 35:47,5:15:2,5, 2,5 мкг/мл)	TRBC KO (Липид A: 35:47,5:15:2,5, 2,5 мкг/мл)
Группа 3	CIITA KO (Липид A: 50:35.5:10:1,5, 2,5 мкг/мл)	HLA-A KO (Липид A: 50:35.5:10:1,5, 2,5 мкг/мл)	TRAC KI (Липид A: 50:35.5:10:1,5, 2,5 мкг/мл)	TRBC KO (Липид A: 50:35.5:10:1,5, 2,5 мкг/мл)
Неотредактированные	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует

[00546] В день 1, композиции LNP, указанные в **Таблице 38**, инкубировали в TCAM, содержащей 5 мкг/мл rhApoE3 (Peprotech 350-02). Тем временем Т-клетки собирали, промывали и ресуспендировали при плотности 2×10 ^6 клеток/мл в TCAM с разведением 1:50 реагента человека T Cell TransAct (Miltenyi, 130-111-160). Т-клетки и среду LNP-ApoE смешивали в соотношении 1:1 и Т-клетки высевали в культуральные флаконы на ночь.

[00547] В день 2, композиции LNP, как указано в **Таблице 38**, инкубировали в концентрации 25 мкг/мл в TCAM, содержащей 20 мкг/мл rhApoE3 (Peprotech, 350-02). Затем к соответствующей культуре добавляли раствор LNP-ApoE в соотношении 10:1.

[00548] В день 3, как указано в **Таблице 38**, композиции TRAC-LNP инкубировали в TCAM, содержащей 5 мкг/мл rhApoE3 (Peprotech 350-02). Тем временем Т-клетки собирали, промывали и ресуспендировали при плотности 1×10^^6 клеток/мл в TCAM. Т-клетки и среду LNP-ApoE смешивали в соотношении 1:1 и Т-клетки высевали в культуральные флаконы. Затем к каждой группе добавляли WT1 AAV при множественности заражения 3×10^^5 GC на клетку. В каждую группу добавляли ингибитор ДНК-РК «Соединение 1» в концентрации 0,25 мкМ.

[00549] На день 4, композиции LNP, указанные в **Таблице 38**, инкубировали в TCAM, содержащей 5 мкг/мл rhApoE3 (Peprotech 350-02). Тем временем Т-клетки собирали, промывали и ресуспендировали при плотности $1\times10^{\wedge6}$ клеток/мл в TCAM. Т-клетки и среду LNP-ApoE смешивали в соотношении 1:1 и Т-клетки высевали в культуральные флаконы.

[00550] С 5 по 13 день Т-клетки переносили на планшет 24- скважина GREX (Wilson Wolf, 80192) в среде для размножения Т-клеток (TCEM: CTS OpTmizer Thermofisher №A3705001) с добавлением 5% сыворотки АВ человека (Gemini №100-512], 1X GlutaMAX (Thermofisher №35050061], 10 мМ HEPES (Thermofisher №15630080), 200 Ед/мл IL-2 (Peprotech №200-02), IL-7 (Peprotech №200-07), IL-15 (Peprotech №200-15) и размножали в соответствии с протоколами производителей. Вкратце, Т-клетки размножали в течение 8 дней с заменой среды каждые 2-3 дня.

[00551] После размножения отредактированные Т-клетки анализировали с помощью проточной цитометрии для определения нокаута HLA-A*02:01, нокдауна HLA-DR-DP-DQ посредством нокаута CIITA, вставки WT1-TCR ($CD3^{+}Vb8^{+}$) и процентной доли клеток, экспрессирующих остаточный эндогенный ($CD3^{+}Vb8^{-}$). Т-клетки инкубировали с коктейлем антител, нацеленных на следующие молекулы: Vb8 (Biolegend, кат. 348104), HLA-A2 (Biolegend, кат. 343320), HLA-DRDPDQ (Biolegend, кат. 361712), CD4 (Biolegend, кат. 300538), CD8 (Biolegend, кат. 301046), CD3 (Biolegend, кат. 317336), CCR7 (Biolegend, кат. 353214), CD62L (Biolegend, кат. 304820), CD45RA (Biolegend, кат. 304134), CD45RO (Biolegend, кат. 304230), CD56 (Biolegend, кат. 318328), Viakrome (Beckman Coulter, кат. C36628). Затем клетки промывали, обрабатывали с помощью прибора Cytoflex LX (Beckman Coulter) и анализировали с применением программного пакета FlowJo. Т-клетки гейтировали по размеру и статусу CD4/CD8, прежде чем были определяли показатели редактирования и вставки. Процент клеток, экспрессирующих соответствующие белки на клеточной поверхности после последовательного конструирования Т-клеток, продемонстрирован в **Таблице 39** и на **Фигуре 17А** для CD8+ Т-клеток соответственно. Процент Т-клеток со всеми предполагаемыми редактурами (вставка WT1-TCR в сочетании с нокаутом HLA-A и CIITA) определяли как % $CD3^{+}Vb8^{+}$ $HLA\text{-}A^{-}HLA\text{-}DRDPDQ^{-}$, что продемонстрировано на **Фигуре 17В**. Высокие уровни нокаута HLA-A и CIITA, а также вставки WT1-TCR наблюдались в отредактированных образцах из всех групп, дающих >75% полностью отредактированных CD8+ Т-клеток. Более низкая доза (0,65 мкг/мл), применяемая для композиции липида А 35:15:47,5:2,5, продемонстрировала такую же эффективность в редактировании Т-клеток для всех целей, что и состав липида А 50:10:35,5:1,5 с более высокой дозой (2,5 мкг/мл).

[00552] **Таблица 39. Показатели редактирования в CD8+ Т-клетках**

	Группа 1			Группа 2			Группа 3			Неотредактированные		
Редактиро	Средне	SD	N	Средне	SD	N	Средн	S	N	Сред	SD	N

вание	e			e			ee	D		нее		
Полностью отредактированные (Vb8+,CD3+,HLA-DRPDPDQ-,HLA-A*02:01-)	79,6	4,7	3,0	80,5	4,2	3,0	76,8	1,9	3,0	0,2	0,2	3,0
HLA-A KO (HLA-A*02:01-)	97,1	3,6	3,0	96,4	4,7	3,0	96,4	4,4	3,0	3,6	3,8	3,0
CIITA KO (HLA-DRDPDQ-)	99,3	0,4	3,0	97,7	2,1	3,0	98,7	0,9	3,0	нд	нд	нд
TCR KO (CD3-)	99,3	0,1	3,0	99,7	0,1	3,0	98,7	1,1	3,0	1,8	1,4	3,0
Вставка WT1 TCR (Vb8+)	82,6	2,0	3,0	85,6	0,8	3,0	81,1	2,1	3,0	0,2	0,2	3,0

Пример 18: Скрининг CIITA-направленной РНК в Т-клетках с помощью BC22n

[00553] Различные онРНК проверяли на их способность нокаутировать ген CIITA в Т-клетках человека с использованием редактирования оснований C на T. Процент Т-клеток, отрицательных в отношении экспрессии белка MHC класса II и/или CD74, анализировали после редактирования CIITA после электропорации мРНК и различными онРНК.

18.1 Подготовка Т-клеток

[00554] Аферез от здоровых доноров был получен коммерчески (Hemacare), клетки были промыты и ресуспендированы в буфере PBS/ЭДТА CliniMACS® (Miltenyi Biotec, кат. № 130-070-525) и обработаны в устройстве MultiMACS™ Cell 24 Separator Plus (Miltenyi Biotec). Т-клетки выделяли посредством положительной селекции с использованием набора CD4/CD8 MicroBead Straightfrom Leukopak® для человека (Miltenyi Biotec, кат. № 130-122-352). Т-клетки разделяли на аликвоты и криоконсервировали для будущего использования в CS10 Cryostor® (StemCell

Technologies, кат. 07930).

[00555] После размораживания Т-клетки высевали с плотностью 1,0×10^6 клеток/мл в среду для роста Т-клеток (TCGM), состоящую из CTS Оптимизированный T Cell Expansion SFM и T Cell Expansion Supplement (ThermoFisher кат. № A1048501), 5% сыворотки АВ человека (GeminiBio, кат. № 100-512) 1X пенициллин-стрептомицина, 1X глутамакса, 10 мМ HEPES, 200 ЕД/мл рекомбинантного интерлейкина-2 человека (Peprotech, кат. № 200-02), 5 нг/мл рекомбинантного интерлейкина 7 человека (Peprotech, кат. № 200-07) и 5 нг/мл рекомбинантного интерлейкина 15 человека (Peprotech, кат. 200-15). Т-клетки выдерживали в этой среде в течение 24 часов, после чего их активировали с помощью реагента T Cell TransAct™ для , человека (Miltenyi, кат. № 130-111-160), добавленного в соотношении 1:100 по объему. Т-клетки активировали за 48 часов до электропорации.

18.2 Редактирование Т-клеток с помощью электропорации РНК

[00556] Растворы, содержащие мРНК, кодирующую белок BC22n (SEQ ID NO: 972) и UGI (SEQ ID NO: 815) готовили в буфере P3. Сто мкМ нацеленных на CIITA онРНК удаляли из их планшетов для хранения, денатурировали в течение 2 минут при 95 °C и инкубировали при комнатной температуре в течение 5 минут. Через 48 часов после активации Т-клетки собирали, центрифугировали и ресуспендировали в концентрации 12,5×10^6 Т-клеток/мл в буфере для электропорации P3 (Lonza). Для электропорации 1×10^5 Т-клеток смешивали с 20 нг/мкл мРНК BC22n, 20 нг/мкл мРНК UGI и 20 пмоль онРНК, в конечном объеме 20 мкл буфера для электропорации P3. Эту смесь в двух повторностях переносили на 96-луночный планшет Nucleofector™ и подвергали электропорации, используя импульсный код производителя. Электропорированные Т-клетки немедленно выдерживали в 80 мкл среды для выращивания Т-клеток CTS Optimizer без цитокинов в течение 15 минут, а затем переносили в новые 96-луночные планшеты с плоским дном, содержащие дополнительные 80 мкл среды для выращивания Т-клетокCTS Optimizer с добавлением 2X цитокинов Полученные планшеты инкубировали при 37°C в течение 10 дней. На 4-й день после электропорации клетки разделяли 1:2 на 2 планшета с U-образным дном. Один планшет собирали для NGS-секвенирования, а другой планшет заполняли свежей средой CTS Optimizer с 1X цитокинов. Этот планшет использовали для проточной цитометрии на 7-й день.

18.3 Проточная цитометрия и NGS-секвенирование

[00557] На 7-й день после редактирования Т-клетки анализировали с помощью проточной цитометрии для определения поверхностной экспрессии CD74 и HLA-DR, DP, DQ. Результаты представлены в **таблице 40**. Вкратце, Т-клетки инкубировали в течение 30 минут при 4 °C со смесью антител, разведенных в буфере для окрашивания клеток (BioLegend, кат. № 420201). Антитела к CD3 (BioLegend, кат. № 317336), CD4 (BioLegend, кат. № 317434), CD8 (BioLegend, кат. № 301046) и Viakrome (Beckman Coulter, кат. № C36628) разбавляли 1:100, а антитела к HLA II-DR (BioLegend, кат. № 327018), HLA II-DP (BD Biosciences кат. № 750872), HLA II-DQ (BioLegend, кат. № 561504) и CD74

(BioLegend, кат. № 326808) разводили до 1:50. Затем клетки промывали, ресуспендировали в 100 мкл буфера для окрашивания клеток и обрабатывали на проточном цитометре Cytoflex (Beckman Coulter). Данные проточной цитометрии анализировали с помощью программного пакета FlowJo. Т-клетки были отобраны на основе размера, формы, жизнеспособности, экспрессии CD8, HLA II-DP, HLA II-DQ, HLA II-DR и CD74.

[00558] **Таблица 40. Процент клеток, отрицательных по поверхностному белку, после геномного редактирования CIITA с помощью BC22n. (n=2)**

ID направляющей	**%HLA II-DP-**		**%HLA II-DQ-**		**%HLA II-DR-**		**%CD74-**	
	Среднее	**SD**	**Среднее**	**SD**	**Среднее**	**SD**	**Среднее**	**SD**
G000502	68,70	3,54	76,30	4,24	76,70	3,96	66,25	5,87
G016788	62,95	1,91	73,40	3,11	73,50	4,38	61,35	4,60
G016053	70,25	6,72	71,50	4,95	73,90	4,10	60,20	6,08
G016103	63,05	6,29	73,95	1,20	75,30	0,71	63,25	1,63
G016114	65,80	1,98	74,70	4,38	75,85	5,30	65,25	5,87
G016117	63,70	0,57	74,60	3,25	76,00	3,11	63,45	5,30
G016034	85,55	2,19	86,30	1,13	87,95	0,07	80,30	0,14
G016035	85,35	3,75	83,55	1,06	84,05	0,35	75,25	1,20
G016039	74,95	0,35	78,20	0,71	78,50	0,28	68,90	1,27
G016040	61,90	0,85	76,30	2,26	77,80	1,56	64,10	2,55
G016041	68,60	1,84	77,30	0,85	76,75	0,35	64,20	0,00
G016043	79,95	1,48	82,55	0,35	82,50	0,71	73,80	0,00
G016044	87,84	3,17	87,80	1,56	88,65	1,34	83,75	1,91
G016045	82,25	2,90	88,70	0,99	88,35	0,78	83,40	0,99
G016047	76,85	0,21	85,40	0,28	85,05	0,21	79,20	0,00
G016050	59,05	1,91	86,80	0,71	83,40	0,57	79,00	0,99
G016052	76,85	0,21	79,25	0,78	80,55	0,92	70,85	1,34
G016054	70,30	1,70	79,85	1,20	79,30	0,42	70,35	0,35
G016055	73,35	1,34	82,15	2,19	82,15	1,77	73,10	1,56
G016056	75,80	1,41	86,05	1,20	86,35	1,34	79,05	1,91
G016057	77,90	0,71	83,95	0,35	84,45	0,21	75,30	0,99
G016058	83,65	2,19	87,25	1,06	88,20	0,99	81,20	1,41
G016060	72,55	0,78	82,70	1,84	83,05	2,47	73,55	2,76
G016061	73,15	6,29	83,10	0,57	82,55	0,21	74,50	0,42

G016063	74,60	7,35	83,75	0,64	83,50	0,71	75,45	0,35
G016064	97,98	0,17	97,80	0,18	96,83	0,13	98,58	0,04
G016065	77,80	0,28	77,70	1,98	80,00	1,56	69,35	3,18
G016068	97,73	0,26	98,07	0,81	97,59	0,66	98,55	0,66
G016071	87,05	4,31	88,55	0,49	89,45	0,49	84,80	0,85
G016074	96,88	0,19	96,34	0,04	95,85	0,57	96,56	0,23
G016075	86,05	0,92	88,20	0,85	88,50	0,14	83,50	1,27
G016076	96,69	0,64	96,67	0,01	96,38	0,02	96,34	0,18
G016077	92,27	2,50	91,20	1,22	91,40	1,44	89,39	1,68
G016078	71,20	0,28	79,55	1,48	80,65	1,48	70,40	0,85
G016079	89,31	1,57	91,24	0,55	90,24	0,00	88,40	0,14
G016081	74,35	0,07	83,05	1,06	83,00	0,42	73,20	1,41
G016082	82,30	5,09	87,50	0,71	88,80	0,14	82,25	0,07
G016083	74,95	4,88	82,90	0,57	83,95	0,21	74,65	1,06
G016085	79,90	2,97	85,40	0,71	87,45	0,07	79,45	0,49
G016086	97,71	0,33	98,06	0,44	96,63	0,08	98,89	0,18
G016087	70,25	9,12	78,55	3,61	78,30	3,39	69,30	4,24
G016088	82,25	5,16	87,40	0,57	88,30	0,42	81,75	1,06
G016089	69,00	1,27	76,65	1,34	79,00	1,70	67,35	1,06
G016091	95,35	0,95	96,81	0,24	96,64	0,25	97,15	0,28
G016092	94,89	0,61	94,87	0,45	95,35	0,83	94,65	0,37
G016093	91,33	0,31	92,35	0,26	93,94	0,23	90,51	0,37
G016094	79,70	4,24	84,85	2,05	85,70	2,69	78,75	2,90
G016095	83,00	2,12	90,55	0,23	90,54	0,24	85,25	0,49
G016097	71,85	6,86	82,80	1,56	82,40	1,27	73,00	1,70
G016098	74,40	5,66	82,35	3,32	83,50	2,69	74,55	4,45
G016099	86,30	2,69	89,71	1,00	90,57	0,35	86,25	1,06
G016100	76,65	1,34	83,90	2,69	86,25	2,19	77,25	3,04
G016101	69,30	0,71	77,55	1,48	78,55	1,77	68,65	1,77
G016102	71,00	1,84	80,70	0,99	80,60	1,56	70,10	0,99
G016106	82,00	1,27	87,55	0,64	88,80	0,71	81,30	1,41
G016108	88,24	3,73	91,49	0,02	91,42	0,66	87,00	0,85
G016109	88,05	0,92	90,20	1,27	90,41	1,85	86,85	2,05
G016110	88,50	3,25	91,12	0,99	90,14	1,05	87,35	1,20

G016111	78,15	0,92	84,45	0,78	85,80	0,85	78,45	1,20
G016112	72,20	3,82	79,85	2,33	81,70	2,26	73,05	2,47
G016115	95,58	1,10	98,36	0,73	97,69	0,48	98,54	0,40
G016116	88,95	0,35	91,15	2,47	92,29	1,79	88,08	2,94
G016066	68,90	0,57	73,20	1,70	74,20	0,99	62,25	2,76
G016113	93,60	1,15	93,02	0,98	93,75	0,66	92,13	1,20
G016084	96,42	0,83	98,38	0,33	97,32	0,69	98,77	0,17
G016104	84,95	1,77	89,69	1,53	91,20	0,97	86,00	1,41
G016070	90,52	0,16	92,10	0,50	92,49	0,64	89,75	0,91
G016090	96,41	1,27	98,06	0,08	97,43	0,15	98,66	0,10
G016048	76,80	1,56	80,60	0,99	81,70	1,41	72,25	2,19
G016051	65,85	20,44	83,15	1,63	84,45	1,34	75,20	2,40
G016073	82,00	1,98	82,65	1,20	83,15	2,76	75,90	0,14
G016037	80,55	1,91	78,05	0,35	80,15	0,07	70,20	0,57
G016038	85,45	0,49	82,45	0,35	84,90	0,28	76,10	1,13
G016046	90,10	0,05	90,75	0,47	91,09	0,86	87,45	0,78
G016049	84,50	0,00	84,90	0,42	86,75	0,07	78,75	0,21
G016036	85,05	1,06	83,15	1,48	85,00	0,99	76,45	2,47
G016080	91,13	2,02	92,11	1,07	92,99	0,97	89,72	1,16
G016096	75,00	4,38	82,90	3,82	83,45	3,61	75,65	4,31
G016032	97,50	0,09	97,42	0,65	96,30	0,33	98,19	0,36
G016033	91,32	0,88	87,75	0,49	88,20	0,28	84,10	0,14
G016030	93,42	0,08	88,10	0,71	88,40	0,42	85,10	0,28
G016067	96,69	0,25	95,82	0,69	95,14	0,64	96,30	0,48
G016031	80,45	1,20	82,10	0,99	83,95	0,07	74,80	0,57
G016062	74,80	11,17	86,60	0,28	86,75	0,35	80,15	0,35
G016059	77,05	3,75	83,05	0,92	83,85	0,92	75,00	1,41
G016105	66,55	5,87	74,90	3,68	76,50	3,68	65,25	3,75
G016107	71,80	4,10	80,70	0,28	80,75	0,49	71,00	0,57
G016042	95,06	0,02	95,90	0,30	94,17	0,35	94,89	1,02
G016069	52,65	3,18	76,35	0,21	75,90	0,28	62,35	0,21
G016072	46,45	4,45	73,50	0,57	71,35	0,92	56,55	0,64

[00559] На 4-й день после редактирования образцы ДНК подвергали ПЦР и последующему NGS-анализу, как описано в Примере 1. В **таблице 41** показаны

результаты редактирования CIITA в Т-клетках, отредактированных с помощью BC22n.

[00560] **Таблица 41. Средний процент редактирование локуса CIITA с помощью BC22n. (n=2)**

ID направляющей	% C в T		% C в A/G		% инделов	
	Среднее	SD	Среднее	SD	Среднее	SD
G000502	84,63	2,39	0,82	0,19	1,26	0,37
G016788	95,63	0,06	0,99	0,39	0,72	0,15
G016053	94,77	1,07	1,66	0,43	0,71	0,02
G016103	95,60	0,97	0,63	0,23	0,75	0,29
G016114	96,42	0,23	0,66	0,59	0,65	0,09
G016117	96,23	0,70	0,82	0,28	0,90	0,17
G016034	93,11	1,07	0,61	0,21	1,49	0,52
G016035	95,41	0,59	0,52	0,31	0,62	0,24
G016039	88,20	1,33	1,51	0,42	7,99	1,32
G016043	88,51	2,91	1,27	0,11	2,23	0,46
G016044	0,13	0,03	90,04	0,38	9,83	0,41
G016045	61,66	0,51	1,73	0,90	7,12	0,22
G016047	92,74	0,48	0,80	0,06	3,00	0,13
G016050	90,63	0,04	1,35	0,38	1,87	0,56
G016052	92,68	1,74	0,83	0,44	3,26	1,66
G016054	90,82	2,94	1,03	0,89	4,38	4,28
G016055	83,61	1,98	0,46	0,21	10,63	1,04
G016056	96,69	0,65	0,30	0,03	0,64	0,35
G016057	93,83	0,35	0,98	0,18	0,99	0,47
G016058	95,49	0,06	0,35	0,14	0,41	0,31
G016060	85,95	0,54	0,49	0,16	7,63	1,63
G016061	92,81	2,51	0,59	0,34	0,75	0,19
G016063	70,60	1,87	0,31	0,15	0,25	0,07
G016064	94,14	2,28	0,81	0,41	0,97	0,33
G016065	57,50	1,68	0,61	0,37	1,15	0,32
G016068	94,26	0,97	0,34	0,16	0,52	0,21
G016071	93,78	0,73	0,84	0,14	2,17	0,40
G016074	93,88	1,20	0,92	0,19	2,41	0,28

G016075	91,72	0,73	0,58	0,15	2,89	0,52
G016076	91,24	1,10	0,28	0,20	3,02	1,02
G016077	94,94	1,07	1,08	0,53	1,50	0,46
G016078	93,52	1,78	0,41	0,15	3,30	1,54
G016079	96,29	0,05	0,51	0,08	0,81	0,13
G016081	75,32	7,28	1,33	1,44	7,61	7,04
G016082	31,35	5,20	0,07	0,14	34,39	6,24
G016083	0,24	0,08	99,63	0,11	0,08	0,06
G016085	80,16	3,07	0,74	0,37	0,36	0,12
G016086	96,02	1,68	1,45	0,46	0,84	0,38
G016087	90,30	1,43	0,32	0,20	5,11	0,54
G016088	92,14	0,51	1,05	0,33	2,24	0,86
G016089	94,49	0,39	0,61	0,30	1,14	0,30
G016091	95,93	0,99	1,03	0,23	0,37	0,09
G016092	95,62	0,79	1,17	0,40	0,71	0,28
G016093	95,74	0,81	0,94	0,43	0,43	0,18
G016094	95,85	1,03	0,58	0,39	0,99	0,48
G016095	94,77	0,52	1,32	0,31	0,72	0,37
G016097	94,90	1,64	0,55	0,19	1,40	0,51
G016098	91,71	1,11	0,48	0,18	0,50	0,36
G016099	93,42	1,55	0,56	0,05	3,64	1,06
G016100	96,54	0,93	0,46	0,22	0,46	0,36
G016101	41,21	1,15	0,77	0,07	0,22	0,04
G016102	96,06	1,23	0,46	0,05	0,69	0,25
G016106	90,41	1,16	3,33	0,54	2,66	0,49
G016108	76,19	0,74	0,42	0,28	0,69	0,38
G016109	94,93	0,35	0,46	0,21	1,86	0,59
G016110	87,64	1,01	0,55	0,20	7,63	0,72
G016111	92,93	1,09	1,17	0,58	2,11	1,08
G016112	1,56	0,46	1,79	0,90	0,03	0,05
G016115	89,86	1,01	0,67	0,29	7,30	0,50
G016116	91,37	0,33	0,54	0,27	0,59	0,09
G016066	1,02	0,16	0,32	0,07	0,40	0,21
G016113	93,23	0,98	1,10	0,16	2,40	0,57

G016084	74,10	1,35	0,87	0,16	21,41	0,94
G016104	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
G016070	94,80	0,30	0,54	0,04	1,66	0,17
G016090	84,09	0,00	0,51	0,00	12,29	0,00
G016048	48,81	1,82	0,78	0,07	0,54	0,18
G016051	95,69	0,45	1,06	0,09	0,91	0,25
G016073	94,11	0,83	0,76	0,18	1,37	0,29
G016037	64,35	3,31	1,61	0,81	3,46	4,94
G016038	94,99	2,01	1,80	0,64	1,25	0,88
G016046	82,29	2,89	0,88	0,54	14,28	2,86
G016049	95,33	0,15	1,41	0,87	0,46	0,66
G016036	71,71	3,82	0,63	0,14	1,94	0,40
G016080	81,09	1,58	1,33	0,47	5,64	0,94
G016096	94,79	0,33	0,45	0,10	1,81	0,37
G016032	90,27	1,53	2,25	2,37	2,97	0,38
G016033	83,90	0,89	1,79	1,63	5,03	0,94
G016030	96,66	1,35	0,65	0,39	0,31	0,14
G016067	95,79	0,26	0,61	0,17	1,37	0,26
G016031	94,51	0,24	0,75	0,07	2,35	0,68
G016062	93,37	0,45	1,17	0,13	1,91	0,33
G016059	90,26	0,93	0,80	0,30	5,62	0,33
G016105	95,81	1,17	0,53	0,24	0,47	0,45
G016107	91,94	2,74	0,66	0,36	3,18	2,72
G016042	90,07	0,00	0,97	0,00	2,51	0,00
G016069	93,31	0,96	0,96	0,31	1,03	0,33
G016072	84,94	7,39	0,39	0,08	11,91	8,00

Пример 19: Скрининг онРНК к CIITA в зависимости от дозы с помощью BC22n в Т-клетках

[00561] Высокоэффективные онРНК CIITA, идентифицированные в Примере 18, дополнительно анализировали на эффективность редактирования оснований при нескольких концентрациях направляющих в Т-клетках. Эффективность каждого из них оценивали по эффективности редактирования генома с помощью NGS или по нарушению экспрессии поверхностных белков HLA-DR, DP, DQ с помощью проточной цитометрии.

19.1 Подготовка Т-клеток

[00562] Аферез от здоровых доноров был получен коммерчески (Hemacare), клетки

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

[00563] После размораживания Т-клетки высевали с плотностью 1,0×10^6 клеток/мл в среду для роста Т-клеток (TCGM), состоящую из CTS OpTmizer T Cell Expansion SFM и T Cell Expansion Supplement (ThermoFisher кат. № A1048501), 5% сыворотки АВ человека (GeminiBio, кат. № 100-512) , 1X пенициллин-стрептомицина, 1X глутамакса, 10 мМ HEPES, 200 ЕД/мл рекомбинантного интерлейкина-2 человека (Peprotech, кат. № 200-02), 5 нг/мл рекомбинантного интерлейкина 7 человека (Peprotech, кат. № 200-07) и 5 нг/мл рекомбинантного интерлейкина 15 человека (Peprotech, кат. 200-15). Т-клетки выдерживали в этой среде в течение 24 часов, после чего их активировали с помощью реагента T Cell TransAct™ для человека (Miltenyi, кат. № 130-111-160), добавленного в соотношении 1:100 по объему. Т-клетки активировали за 48 часов до электропорации.

19.2 Редактирование Т-клеток с помощью электропорации РНК

[00564] Растворы, содержащие мРНК, кодирующую белок BC22n (SEQ ID NO: 972) и UGI (SEQ ID NO: 815) готовили в буфере P3. 100 мкМ нацеленных на CIITA онРНК удаляли из их планшетов для хранения, денатурировали в течение 2 минут при 95 °C и инкубировали при комнатной температуре в течение 5 минут. Через 48 часов после активации Т-клетки собирали, центрифугировали и ресуспендировали в концентрации $12{,}5\times10^{6}$ Т-клеток/мл в буфере для электропорации P3 (Lonza). Каждую онРНК серийно разбавляли в соотношении 1:2 в буфере для электропорации P3, начиная с 60 пмоль, в 96-луночном планшете для ПЦР в двух повторностях. После разбавления 1×10^{5} Т-клеток, 20 нг/мкл мРНК BC22n и 20 нг/мкл мРНК UGI смешивали в планшете с онРНК, чтобы получить конечный объем 20 мкл буфера для электропорации P3. Эту смесь повторностях переносили в 4 соответствующих 96-луночных планшета Nucleofector™ и подвергали электропорации, используя импульсный код производителя. Электропорированные Т-клетки немедленно выдерживали в 80 мкл среды для выращивания Т-клеток CTS Optimizer без цитокинов в течение 15 минут, а затем переносили в новые 96-луночные планшеты с плоским дном, содержащие дополнительные 80 мкл среды для выращивания Т-клеток CTS OpTmizer с добавлением 2X цитокинов Полученные планшеты инкубировали при 37°C в течение 7 дней. На 4-й день после электропорации клетки разделяли 1:2 на два планшета с U-образным дном и один планшет собирали для NGS-секвенирования, а другой планшет заполняли свежей средой CTS Optimizer с 1X цитокинов. Этот планшет использовали для проточной цитометрии на 7-й день.

19.3 Проточная цитометрия и NGS-секвенирование

[00565] На 7-й день после редактирования Т-клетки анализировали с помощью проточной цитометрии для определения поверхностной экспрессии HLA-DR, DP, DQ. Вкратце, Т-клетки инкубировали в течение 30 минут при 4 °C со смесью антител, разведенных в буфере для окрашивания клеток (BioLegend, кат. № 420201). Антитела к CD3 (BioLegend, кат. № 317336), CD4 (BioLegend, кат. № 317434), CD8 (BioLegend, кат. № 301046) и Viakrome (Beckman Coulter, кат. № C36628) разбавляли 1:100, а антитела к HLA II-DR, DP, DQ (BioLegend, кат. № 361714) разводили до 1:50. Затем клетки промывали, ресуспендировали в 100 мкл буфера для окрашивания клеток и обрабатывали на проточном цитометре Cytoflex (Beckman Coulter). Данные проточной цитометрии анализировали с помощью программного пакета FlowJo. Т-клетки были отобраны по размеру, форме, жизнеспособности, CD8 и HLA-DR, DP, DQ.

[00566] В **Таблице 42** показаны результаты редактирования CIITA и процент Т-клеток отрицательных по HLA-DR, DP, DQ в Т-клетках после редактирования оснований с помощью BC22n.

[00567] **Таблица 42. Процент редактирования и процент отрицательных по HLA II-DP, DQ, DR клеток после редактирования CIITA с помощью редактора оснований BC22n**

		C>T			**% HLA II-DR, DP, DQ**			**% CD74**		
	онРНК (пмоль)	**Сред**	**SD**	**N**	**Сред**	**SD**	**N**	**Сред**	**SD**	**N**
G016064	60	96,20%	0,69%	2	99,65	0,07	2	96,2	0,14	2
	30	94,85%	0,69%	2	99,15	0,35	2	92,65	0,21	2
	15	90,26%	0,03%	2	96,70	0,28	2	90,15	2,19	2
	7,5	72,95%	1,76%	2	87,45	1,20	2	80,95	3,32	2
	3,75	49,55%	2,09%	2	73,05	0,64	2	66,35	4,31	2
	1,88	28,63%	1,34%	2	59,40	1,70	2	55,2	5,8	2
	0,94	14,98%	0,01%	2	54,60	2,40	2	46,9	1,84	2
	0	0,26%	0,02%	2	46,70	5,52	2	45,15	0,49	2
G016068	60	97,40%	0,87%	2	99,70	0,00	2	94,25	1,2	2
	30	90,31%	0,83%	2	93,15	0,07	2	85,15	1,2	2
	15	75,08%	0,17%	2	82,45	0,21	2	74,65	1,48	2
	7,5	49,64%	2,08%	2	68,65	1,91	2	57	1,27	2
	3,75	28,95%	1,51%	2	57,85	1,63	2	43,9	1,27	2
	1,88	14,90%	0,58%	2	51,10	2,26	2	35,85	3,75	2

	0,94	7,11%	0,22%	2	49,50	4,67	2	38,2	4,1	2
	0	0,21%	0,02%	2	51,50	1,13	2	44,8	1,56	2
G016074	60	96,62%		2	96,95	0,21	2	90,6	0,28	2
	30	94,89%	0,58%	2	93,50	1,27	2	85,45	1,06	2
	15	89,79%	3,18%	2	88,50	0,28	2	80,35	0,64	2
	7,5	72,00%	1,61%	2	77,75	0,35	2	68,35	1,77	2
	3,75	47,99%	0,39%	2	65,30	1,84	2	53,05	1,91	2
	1,88	27,92%	0,44%	2	57,60	0,14	2	45	0,42	2
	0,94	13,11%	1,79%	2	54,30	0,71	2	37,9	0	2
	0	0,41%	0,13%	2	49,15	2,05	2	44,05	1,91	2
G016076	60	96,03%	0,07%	2	94,30	0,14	2	90	0,71	2
	30	93,29%	н/д	2	89,10	0,99	2	81,65	1,48	2
	15	80,74%	0,41%	2	83,55	0,35	2	74,1	0,85	2
	7,5	51,33%	1,82%	2	69,05	1,91	2	57,7	2,97	2
	3,75	28,40%	2,41%	2	58,90	2,26	2	43,15	0,64	2
	1,88	15,12%	1,91%	2	56,05	0,78	2	38,45	1,77	2
	0,94	7,23%	0,26%	2	52,80	0,71	2	38,2	0,28	2
	0	0,27%	0,00%	2	47,70	1,70	2	43,5	3,68	2
G016086	60	97,81%	0,16%	2	99,25	0,35	2	94,35	0,92	2
	30	н/д	н/д	2	98,65	0,07	2	90,25	1,2	2
	15	н/д	н/д	2	98,20	0,28	2	88,8	1,98	2
	7,5	97,19%	1,91%	2	95,85	0,07	2	87,5	0,14	2
	3,75	н/д	н/д	2	87,10	0,28	2	74,95	2,47	2
	1,88	н/д	н/д	2	72,45	0,07	2	60,75	2,76	2
	0,94	н/д	н/д	2	59,10	0,85	2	48,05	3,89	2
	0	н/д	н/д	2	50,65	2,76	2	46,15	2,19	2
G016091	60	н/д	н/д	2	98,05	0,07	2	89,85	0,21	2
	30	н/д	н/д	2	96,95	0,07	2	87,9	0,85	2
	15	н/д	н/д	2	91,40	1,84	2	83,65	2,76	2
	7,5	н/д	н/д	2	82,00	1,27	2	74	3,11	2
	3,75	н/д	н/д	2	69,70	0,99	2	62,75	2,33	2
	1,88	н/д	н/д	2	59,40	1,41	2	54,4	3,54	2

	0,94	н/д	н/д	2	54,25	2,05	2	46,3	5,09	2
	0	н/д	н/д	2	46,30	2,26	2	48,3	4,67	2
G016115	60	93,33%	0,70%	2	96,80	0,14	2	92,55	0,07	2
	30	94,46%	0,23%	2	92,70	1,41	2	87,8	1,98	2
	15	93,51%	0,70%	2	89,85	0,35	2	82,75	3,75	2
	7,5	90,13%	0,37%	2	83,35	0,35	2	78,35	2,47	2
	3,75	75,18%	1,51%	2	71,40	1,27	2	65,5	2,4	2
	1,88	51,65%	1,64%	2	64,20	4,95	2	56,1	1,84	2
	0,94	30,19%	2,14%	2	55,25	3,04	2	49,15	4,88	2
	0	0,26%	0,03%	2	46,85	7,57	2	47,1	3,25	2
G016084	60	73,43%	0,13%	2	97,00	0,14	2	91,35	1,06	2
	30	73,70%	0,38%	2	94,80	0,42	2	84,9	0,42	2
	15	67,30%	1,19%	2	91,60	0,71	2	80,6	0,57	2
	7,5	48,91%	0,27%	2	80,20	0,00	2	67,5	0,42	2
	3,75	28,24%	0,35%	2	67,50	0,57	2	51,85	3,18	2
	1,88	16,89%	0,30%	2	59,05	2,76	2	42,7	0,14	2
	0,94	7,42%	0,06%	2	54,65	0,92	2	40,05	0,78	2
	0	1,06%	0,06%	2	49,25	2,47	2	46,9	1,98	2
G016090	60	87,05%	2,52%	2	98,70	1,27	2	93,25	2,19	2
	30	88,93%	0,06%	2	98,90	0,14	2	91	0,99	2
	15	89,51%	0,24%	2	98,70	0,28	2	90,45	0,21	2
	7,5	83,78%	0,02%	2	93,80	0,57	2	85,05	0,07	2
	3,75	66,23%	0,40%	2	83,35	1,06	2	72,35	0,35	2
	1,88	44,49%	0,27%	2	69,50	0,57	2	57,75	1,34	2
	0,94	22,90%	1,49%	2	57,25	1,77	2	45,15	2,47	2
	0	0,61%	0,14%	2	49,55	1,63	2	47,5	4,1	2
G016032	60	91,66%	0,76%	2	99,35	0,07	2	93,65	2,05	2
	30	86,77%	2,13%	2	94,25	1,06	2	87,45	1,63	2
	15	75,23%	1,22%	2	86,10	2,26	2	74,65	0,78	2
	7,5	54,08%	0,63%	2	74,10	0,85	2	60,65	1,34	2
	3,75	33,34%	2,39%	2	63,20	3,82	2	45,95	3,75	2
	1,88	16,30%	1,21%	2	57,20	0,57	2	39,7	0,28	2

	0,94	7,33%	0,38%	2	53,10	0,85	2	37,6	1,13	2
	0	0,33%	0,00%	2	52,65	4,31	2	47,75	2,62	2
G016067	60	97,37%	0,56%	2	93,10	0,14	2	85,95	2,19	2
	30	97,47%	0,36%	2	93,00	0,28	2	81,8	3,54	2
	15	95,78%	0,13%	2	89,30	1,41	2	79,45	0,49	2
	7,5	86,53%	0,24%	2	81,05	2,19	2	71	2,26	2
	3,75	68,12%	1,27%	2	69,35	1,20	2	58,3	2,4	2
	1,88	43,82%	0,48%	2	57,70	1,98	2	48,2	0,99	2
	0,94	22,80%	1,26%	2	54,95	0,35	2	42,55	1,34	2
	0	0,14%	0,06%	2	49,55	1,63	2	43,7	1,98	2

Пример 20: Редактирование Т-клеток человека с помощью BC22n, UGI и 91-мерных онРНК

[00568] Эффективность редактирования оснований 91-мерной онРНК, оцененной по нокауту NGS и рецептора, сравнивали с эффективностью 100-мерного формата онРНК с той же направляющей последовательностью.

[00569] Протестированная 91-мерная онРНК содержит направляющую последовательность из 20 нуклеотидов (представленную N) и направляющий каркас, как показано ниже: mN*mN*mN*NNNNNNNNNNNNNNNNNGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUm AmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCACGAAAGGGCACCGAGUCGGmU mGmC*mU (SEQ ID NO: 1006), где A, C, G, U и N представляют собой аденин, цитозин, гуанин, урацил и любой рибонуклеотид соответственно, если не указано иное. Символ m указывает на модификацию 2'O-метила, а * указывает на фосфоротиоатную связь между нуклеотидами. Немодифицированные и модифицированные версии направляющих представлены в Таблице 4 (Таблица последовательностей).

Пример 20.1: Подготовка Т-клеток

[00570] Аферез здоровых доноров был получен коммерчески (Hemacare), клетки были промыты и ресуспендированы в буфере PBS/ЭДТА CliniMACS® (Miltenyi Biotec, кат. № 130-070-525) и обработаны в устройстве MultiMACS™ Cell 24 Separator Plus (Miltenyi Biotec). Т-клетки выделяли посредством положительной селекции с использованием набора CD4/CD8 MicroBead Straightfrom Leukopak® для человека (Miltenyi Biotec, кат. № 130-122-352). Т-клетки разделяли на аликвоты и криоконсервировали для будущего использования в CS10 Cryostor® (StemCell Technologies, кат. 07930).

[00571] После размораживания Т-клетки высевали с плотностью 1,0×10 ^6/мл в среду для роста Т-клеток (TCGM), состоящую из CTS OpTmizer T Cell Expansion SFM и T Cell Expansion Supplement (ThermoFisher кат. № A1048501), 5% сыворотки АВ человека

(GeminiBio, кат. № 100-512) 1X пенициллин-стрептомицина, 1X глутамакса, 10 мМ HEPES, 200 ЕД/мл рекомбинантного интерлейкина-2 человека (Peprotech, кат. № 200-02), 5 нг/мл рекомбинантного интерлейкина 7 человека (Peprotech, кат. № 200-07) и 5 нг/мл рекомбинантного интерлейкина 15 человека (Peprotech, кат. 200-15). Т-клетки выдерживали в этой среде в течение 24 часов, после чего их активировали с помощью реагента T Cell TransAct™ для человека (Miltenyi, кат. № 130-111-160), добавленного в соотношении 1:100 по объему. Т-клетки активировали в течение 48 часов до обработки LNP.

Пример 20.2: Обработка LNP и размножение Т-клеток

[00572] Через 48 часов после активации собирали Т-клетки, центрифугировали при 500 g в течение 5 минут и ресуспендировали в концентрации 1×10^6 Т-клеток/мл в среде для посева Т-клеток (TCPM): версия без сыворотки. TCGM, содержащего 400 ЕД/мл рекомбинантного человеческого интерлейкина-2 (Peprotech, кат. № 200-02), 10 нг/мл рекомбинантного интерлейкина 7 человека (Peprotech, кат. № 200-07) и 10 нг/мл рекомбинантного интерлейкина 15 человека (Peprotech, кат. 200-15). 50 мкл Т-клеток в TCPM ($5\times10^{\wedge4}$ Т-клеток) добавляли на лунку для обработки в плоскодонных 96-луночных планшетах.

[00573] LNP готовили, как описано в Примере 1, в соотношении 35:47,5:15:2,5 (липид A/холестерин/DSPC/PEG2k-DMG). LNP объединяли при молярном соотношении аминолипида к фосфату РНК (N:P) около 6. LNP инкапсулировали один вид РНК, либо онРНК, как описано в **Таблице 43**, либо мРНК BC22n (SEQ ID NO: 972) или мРНК UGI (SEQ ID NO: 815).

Таблица 43-100-мерные и 91-мерные онРНК.

Целевой ген	100-мерные	91-мерные
CIITA	G016086 (SEQ ID NO: 395)	G023521 (SEQ ID NO: 1008)

[00574] Перед обработкой Т-клетками LNP, инкапсулирующие онРНК, разбавляли до 6,64 мкг/мл в среде для обработки Т-клеток (TCTM): версии TCGM, содержащей 20 мкг/мл rhApoE3 в отсутствие интерлейкинов 2, 5 или 7. Эти LNP инкубировали при 37°C в течение 15 минут и серийно разбавляли 1:4 с применением TCTM, что приводило к 8-ступенчатой серии разведений в диапазоне от 6,64 мкг/мл до нуля. Аналогично, LNP с одним грузом с мРНК BC22n (SEQ ID NO: 972) или мРНК UGI (SEQ ID NO: 815) Разводили в TCTM до 3,32 и 1,67 мкг/мл соответственно, инкубировали при 37°C в течение 15 минут и смешивали 1:1 по объему с LNP онРНК, серийно разведенными на предыдущем этапе. Наконец, 50 мкл полученной смеси добавляли к Т-клеткам в 96-луночных планшетах в соотношении 1:1 по объему. Т-клетки инкубировали при 37°C в течение 24 часов, после чего их собирали, центрифугировали при 500 g в течение 5 минут, ресуспендировали в 200 мкл TCGM и возвращали в инкубатор.

Пример 20.3: Оценка результатов редактирования с помощью

секвенирования нового поколения (NGS)

[00575] Через четыре дня после обработки LNP Т-клетки подвергали лизису, ПЦР-амплификации каждого локуса-мишени и последующему анализу NGS, как описано в Примере 1. В **таблице 44** и на **Фиг. 18** показаны уровни редактирования и чистота редактирования от С до Т в Т-клетках, обработанных уменьшающейся массой 100-мерной или 91-мерной онРНК, нацеленной на CIITA.

[00576] По сравнению со 100-мерной версией 91-мерная онРНК приводила к более высокой частоте редактирования при доставке в той же концентрации. Никаких различий в чистоте редактирования С в Т не наблюдалось между 100-мерными и 91-мерными онРНК.

Таблица 44 - Средний процент редактирования локуса CIITA в Т-клетках, обработанных онРНК в формате 100-мер (G016086) или 91-мер (G023521).

	CIITA											
	100-мерные						**91-мерные**					
	С в Т		**С в A/G**		**Инделы**		**С в Т**		**С в A/G**		**Инделы**	
онРНК (нг)	**Среднее**	**SD**	**Среднее**	**SD**	**Среднее**	**SD**	**Среднее**	**SD**	**Среднее**	**SD**	**Среднее**	**SD**
166,00	98,1	0,2	0,7	0,1	0,6	0,1	96,9	0,3	1,3	0,0	1,4	0,2
41,50	97,3	0,2	0,4	0,1	0,3	0,1	98,1	0,2	0,6	0,1	0,8	0,1
10,38	82,9	0,3	0,3	0,0	0,2	0,1	97,5	0,4	0,5	0,2	0,4	0,1
2,59	43,3	0,5	0,3	0,1	0,2	0,1	88,0	1,1	0,4	0,1	0,3	0,1
0,65	14,5	0,9	0,3	0,1	0,1	0,1	50,4	1,9	0,3	0,1	0,1	0,1
0,16	4,3	0,2	0,2	0,1	0,0	0,0	17,7	0,5	0,3	0,0	0,1	0,1
0,04	1,8	0,2	0,3	0,1	0,1	0,0	5,7	0,1	0,2	0,1	0,1	0,0
0,00	0,6	0,1	0,2	0,1	0,1	0,0	0,8	0,0	0,2	0,1	0,1	0,0

Пример 20.4: Оценка нокаута рецепторов с помощью проточной цитометрии

[00577] Через семь дней после обработки LNP Т-клетки анализировали с помощью проточной цитометрии для оценки нокаута рецепторов. Т-клетки инкубировали с фиксирующим красителем жизнеспособности (Beckman Coulter, кат. C36628) и коктейлем антител, нацеленных на HLA-DR, DP, DQ (Biolegend, кат. 361714). Затем клетки промывали, анализировали на приборе Cytoflex LX (Beckman Coulter) с помощью пакета программ FlowJo. Перед определением экспрессии каких-либо маркеров Т-клетки гейтировали по размеру, жизнеспособности и позитивности относительно CD8. Полученные данные были нанесены на GraphPad Prism v. 9.0.2 и проанализированы с применением нелинейной регрессии с переменным наклоном (четыре параметра).

[00578] Как показано в **Таблицах 45-46** и на **Фиг. 19**, все протестированные 91-мерные онРНК превзошли свои 100-мерные версии. Мишени с более низкой активностью (т. е. с более высокой EC50) в 100-мерном формате (CIITA), по-видимому, получают наибольшую пользу от использования 91-мерных онРНК.

Таблица 45 - Средний процент CD8+ Т-клеток, которые являются негативными в отношении поверхностных рецепторов HLA-DR, DP, DQ после обработки онРНК, нацеленной на CIITA, в 100-мерном или 91-мерном форматах, соответственно.

онРН (нг)	CIITA (HLA-DR, DP, DQ-)			
	100-мерные		91-мерные	
	Среднее	SD	Среднее	SD
166,00	98,3	0,2	98,7	0,2
41,50	96,9	0,7	98,4	0,3
10,38	85,2	0,7	97,7	0,3
2,59	58,7	0,2	89,4	1,3
0,65	44,8	1,1	63,4	0,5
0,16	38,2	1,6	45,2	2,6
0,04	37,8	1,0	38,2	0,5
0,00	35,1	2,5	37,6	1,7

Таблица 46 - Количество (пмоль) онРНК, которое приводит к 50% потере экспрессии рецептора на поверхности CD8+ Т-клеток (EC50). Крайний правый столбец демонстрирует кратное увеличение эффективности, достигаемое 91-мерной онРНК, по сравнению со 100-мерной онРНК с той же направляющей последовательностью.

Целевой ген	100-мерные		91-мерные		EC50 сдвиг (100-мерные/91-
	sgRNA ID	EC50 (пмоль)	sgRNA ID	EC50 (пмоль)	

					мерные)
CIITA	G016086	0.123	G023521	0.027	4,60

Пример 21. Дополнительные варианты осуществления

[00579] Изобретение дополнительно включает следующие варианты осуществления.

[00580] Вариант осуществления 1 представляет собой сконструированную клетку, в которой снижена или устранена поверхностная экспрессия MHC класса II по сравнению с немодифицированной клеткой, содержащую генетическую модификацию в гене CIITA, при этом генетическая модификация включает по меньшей мере один нуклеотид экзона в пределах геномных координат chr16:10902662-chr16:10923285.

[00581] Вариант осуществления 2 представляет собой сконструированную клетку по варианту осуществления 1, в которой генетическая модификация включает по меньшей мере 5 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат chr16:10902662-chr16:10923285.

[00582] Вариант осуществления 3 представляет собой сконструированную клетку в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, в которой генетическая модификация включает по меньшей мере 6, 7, 8, 9 или 10 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат chr16:10902662-chr16:10923285.

[00583] Вариант осуществления 4 представляет собой сконструированную клетку в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, в которой генетическая модификация содержит по меньшей мере одну замену C на T или по меньшей мере одну замену A на G в пределах геномных координат chr16:10902662-chr16:10923285.

[00584] Вариант осуществления 5 представляет собой сконструированную клетку в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающийся тем, что генетическая модификация включает по меньшей мере один нуклеотид в экзоне в пределах геномных координат chr16:10906542-chr16:10923285.

[00585] Вариант осуществления 6 представляет собой сконструированную клетку в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающийся тем, что генетическая модификация включает по меньшей мере один нуклеотид в экзоне в пределах геномных координат chr16:10906542-chr16:10908121.

[00586] Вариант осуществления 7 представляет собой сконструированную клетку в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, в которой генетическая модификация включает по меньшей мере один нуклеотид экзона в пределах геномных координат, выбранных из: chr16:10907539-10907559, chr16:10916426-10916446, chr16:10906907-10906927, chr16:10895702-10895722, chr16:10907757-10907777, chr16:10907623-10907643, chr16:10915626-10915646, chr16:10906756-10906776, chr16:10907476-10907496, chr16:10907385-10907405 и chr16:10923265-10923285.

[00587] Вариант осуществления 8 представляет собой сконструированную клетку в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, в которой генетическая

модификация включает по меньшей мере один нуклеотид экзона в пределах геномных координат, выбранных из: chr16:10916432-10916452, chr16:10922444-10922464, chr16:10907924-10907944, chr16:10906985-10907005, chr16:10908073-10908093, chr16:10907433-10907453, chr16:10907979-10907999, chr16:10907139-10907159, chr16:10922435-10922455, chr16:10907384-10907404, chr16:10907434-10907454, chr16:10907119-10907139, chr16:10907539-10907559, chr16:10907810-10907830, chr16:10907315-10907335, chr16:10916426-10916446, chr16:10909138-10909158, chr16:10908101-10908121, chr16:10907790-10907810, chr16:10907787-10907807, chr16:10907454-10907474, chr16:10895702-10895722, chr16:10902729-10902749, chr16:10918492-10918512, chr16:10907932-10907952, chr16:10907623-10907643, chr16:10907461-10907481, chr16:10902723-10902743, chr16:10907622-10907642, chr16:10922441-10922461, chr16:10902662-10902682, chr16:10915626-10915646, chr16:10915592-10915612, chr16:10907385-10907405, chr16:10907030-10907050, chr16:10907935-10907955, chr16:10906853-10906873, chr16:10906757-10906777, chr16:10907730-10907750 и chr16:10895302-10895322.

[00588] Вариант осуществления 9 представляет собой сконструированную клетку в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, в которой генетическая модификация включает по меньшей мере один нуклеотид экзона в пределах геномных координат, выбранных из: chr16:10906853-10906873, chr16:10922444-10922464, chr16:10907924-10907944, chr16:10907315-10907335, chr16:10916432-10916452, chr16:10907932-10907952, chr16:10915626-10915646, chr16:10907586-10907606, chr16:10916426-10916446, chr16:10907476-10907496, chr16:10907787-10907807, chr16:10907979-10907999, chr16:10906904-10906924 и chr16:10909138-10909158.

[00589] Вариант осуществления 10 представляет собой сконструированную клетку в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающийся тем, что генетическая модификация включает по меньшей мере один нуклеотид в экзоне в пределах геномных координат выбранных из: chr16:10895702-10895722, chr16:10916432-10916452, chr16:10907623-10907643, chr16:10907932-10907952, chr16:10906985-10907005, chr16:10915626-10915646, chr16:10907539-10907559, chr16:10916426-10916446, chr16:10907476-10907496, chr16:10907119-10907139, chr16:10907979-10907999 и chr16:10909138-10909158.

[00590] Вариант осуществления 11 представляет собой сконструированную клетку в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, в которой генетическая модификация включает по меньшей мере один нуклеотид экзона в пределах геномных координат, выбранных из: chr16:10906853-10906873, chr16:10906757-10906777, chr16:10895302-10895322, chr16:10907539-10907559, chr16:10907730-10907750, chr16:10895702-10895722.

[00591] Вариант 12 представляет собой сконструированную клетку в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, в которой генетическая модификация включает по меньшей мере один нуклеотид экзона в пределах геномных координат,

выбранных из: chr16:10906853-10906873, chr16:10922444-10922464 и chr16:10916432-10916452.

[00592] Вариант осуществления 13 представляет собой сконструированную клетку в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающийся тем, что генетическая модификация включает по меньшей мере один нуклеотид в экзоне в пределах геномных координат chr16:10906853-10906873.

[00593] Вариант осуществления 14 представляет собой сконструированную клетку в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающийся тем, что генетическая модификация включает по меньшей мере один нуклеотид в экзоне в пределах геномных координат chr16:10922444-10922464.

[00594] Вариант осуществления 15 представляет собой сконструированную клетку в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающийся тем, что генетическая модификация включает по меньшей мере один нуклеотид в экзоне в пределах геномных координат chr16:10916432-10916452.

[00595] Вариант осуществления 16 представляет собой сконструированную клетку в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающийся тем, что генетическая модификация включает по меньшей мере один нуклеотид в экзоне в пределах геномных координат chr16:10906757-10906777.

[00596] Вариант осуществления 17 представляет собой сконструированную клетку в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающийся тем, что генетическая модификация включает по меньшей мере один нуклеотид в экзоне в пределах геномных координат chr16:10895302-10895322.

[00597] Вариант осуществления 18 представляет собой сконструированную клетку в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающийся тем, что генетическая модификация включает по меньшей мере один нуклеотид в экзоне в пределах геномных координат chr16:10907539-10907559.

[00598] Вариант осуществления 19 представляет собой сконструированную клетку в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающийся тем, что генетическая модификация включает по меньшей мере один нуклеотид в экзоне в пределах геномных координат chr16:10907730-10907750.

[00599] Вариант осуществления 20 представляет собой сконструированную клетку в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающийся тем, что генетическая модификация включает по меньшей мере один нуклеотид в экзоне в пределах геномных координат chr16:10895702-10895722.

[00600] Вариант осуществления 21 представляет собой сконструированную клетку в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающийся тем, что генетическая модификация включает по меньшей мере один нуклеотид в экзоне в пределах геномных координат chr16:10907932-10907952.

[00601] Вариант осуществления 22 представляет собой сконструированную клетку в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающийся тем,

что генетическая модификация включает по меньшей мере один нуклеотид в экзоне в пределах геномных координат chr16:10907476-10907496.

[00602] Вариант осуществления 23 представляет собой сконструированную клетку в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающийся тем, что генетическая модификация включает по меньшей мере один нуклеотид в экзоне в пределах геномных координат chr16:10909138-10909158.

[00603] Вариант осуществления 24 представляет собой сконструированную клетку, в которой снижена или устранена поверхностная экспрессия MHC класса II по сравнению с немодифицированной клеткой, содержащую генетическую модификацию в гене CIITA, при этом генетическая модификация включает индел, замену C на T или замену A на G в пределах геномных координат выбранных из: chr16:10902662-10902682, chr16:10902723-10902743, chr16:10902729-10902749, chr16:10903747-10903767, chr16:10903824-10903844, chr16:10903824-10903844, chr16:10903848-10903868, chr16:10904761-10904781, chr16:10904764-10904784, chr16:10904765-10904785, chr16:10904785-10904805, chr16:10906542-10906562, chr16:10906556-10906576, chr16:10906609-10906629, chr16:10906610-10906630, chr16:10906616-10906636, chr16:10906682-10906702, chr16:10906756-10906776, chr16:10906757-10906777, chr16:10906757-10906777, chr16:10906821-10906841, chr16:10906823-10906843, chr16:10906847-10906867, chr16:10906848-10906868, chr16:10906853-10906873, chr16:10906904-10906924, chr16:10906907-10906927, chr16:10906913-10906933, chr16:10906968-10906988, chr16:10906970-10906990, chr16:10906985-10907005, chr16:10907030-10907050, chr16:10907058-10907078, chr16:10907119-10907139, chr16:10907139-10907159, chr16:10907172-10907192, chr16:10907272-10907292, chr16:10907288-10907308, chr16:10907314-10907334, chr16:10907315-10907335, chr16:10907325-10907345, chr16:10907363-10907383, chr16:10907384-10907404, chr16:10907385-10907405, chr16:10907433-10907453, chr16:10907434-10907454, chr16:10907435-10907455, chr16:10907441-10907461, chr16:10907454-10907474, chr16:10907461-10907481, chr16:10907476-10907496, chr16:10907539-10907559, chr16:10907586-10907606, chr16:10907589-10907609, chr16:10907621-10907641, chr16:10907622-10907642, chr16:10907623-10907643, chr16:10907730-10907750, chr16:10907731-10907751, chr16:10907757-10907777, chr16:10907781-10907801, chr16:10907787-10907807, chr16:10907790-10907810, chr16:10907810-10907830, chr16:10907820-10907840, chr16:10907870-10907890, chr16:10907886-10907906, chr16:10907924-10907944, chr16:10907928-10907948, chr16:10907932-10907952, chr16:10907935-10907955, chr16:10907978-10907998, chr16:10907979-10907999, chr16:10908069-10908089, chr16:10908073-10908093, chr16:10908101-10908121, chr16:10909056-10909076, chr16:10909138-10909158, chr16:10910195-10910215, chr16:10910196-10910216, chr16:10915592-10915612, chr16:10915626-10915646, chr16:10916375-10916395, chr16:10916382-10916402, chr16:10916426-10916446, chr16:10916432-10916452, chr16:10918486-10918506, chr16:10918492-10918512, chr16:10918493-10918513,

chr16:10922435-10922455, chr16:10922441-10922461, chr16:10922441-10922461, chr16:10922444-10922464, chr16:10922460-10922480, chr16:10923257-10923277 и chr16:10923265-10923285.

[00604] Вариант осуществления 25 представляет собой сконструированную клетку в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, в которой генетическая модификация включает по меньшей мере один нуклеотид экзона в пределах геномных координат, выбранных из: chr16:10916432-10916452, chr16:10922444-10922464, chr16:10907924-10907944, chr16:10906985-10907005, chr16:10908073-10908093, chr16:10907433-10907453, chr16:10907979-10907999, chr16:10907139-10907159, chr16:10922435-10922455, chr16:10907384-10907404, chr16:10907434-10907454, chr16:10907119-10907139, chr16:10907539-10907559, chr16:10907810-10907830, chr16:10907315-10907335, chr16:10916426-10916446, chr16:10909138-10909158, chr16:10908101-10908121, chr16:10907790-10907810, chr16:10907787-10907807, chr16:10907454-10907474, chr16:10895702-10895722, chr16:10902729-10902749, chr16:10918492-10918512, chr16:10907932-10907952, chr16:10907623-10907643, chr16:10907461-10907481, chr16:10902723-10902743, chr16:10907622-10907642, chr16:10922441-10922461, chr16:10902662-10902682, chr16:10915626-10915646, chr16:10915592-10915612, chr16:10907385-10907405, chr16:10907030-10907050, chr16:10907935-10907955, chr16:10906853-10906873, chr16:10906757-10906777, chr16:10907730-10907750, chr16:10907586-10907606, chr16:10907476-10907496, chr16:10906904-10906924 и chr16:10895302-10895322.

[00605] Вариант осуществления 26 представляет собой сконструированную клетку в соответствии с вариантами осуществления 24 или 25, в которой генетическая модификация включает по меньшей мере один нуклеотид экзона в пределах геномных координат, выбранных из: chr16:10907539-10907559, chr16:10916426-10916446, chr16:10906907-10906927, chr16:10895702-10895722, chr16:10907757-10907777, chr16:10907623-10907643, chr16:10915626-10915646, chr16:10906756-10906776, chr16:10907476-10907496, chr16:10907385-10907405 и chr16:10923265-10923285.

[00606] Вариант осуществления 27 представляет собой сконструированную клетку в соответствии с вариантами осуществления 24 или 25, в которой генетическая модификация включает по меньшей мере один нуклеотид экзона в пределах геномных координат, выбранных из: chr16:10906853-10906873, chr16:10922444-10922464, chr16:10907924-10907944, chr16:10907315-10907335, chr16:10916432-10916452, chr16:10907932-10907952, chr16:10915626-10915646, chr16:10907586-10907606, chr16:10916426-10916446, chr16:10907476-10907496, chr16:10907787-10907807, chr16:10907979-10907999, chr16:10906904-10906924 и chr16:10909138-10909158.

[00607] Вариант осуществления 28 представляет собой сконструированную клетку согласно вариантам осуществления 24 или 25, в которой генетическая модификация включает по меньшей мере один нуклеотид экзона в пределах геномных координат, выбранных из: chr16:10895702-10895722, chr16:10916432-10916452, chr16:10907623-

10907643, chr16:10907932-10907952, chr16:10906985-10907005, chr16:10915626-10915646, chr16:10907539-10907559, chr16:10916426-10916446, chr16:10907476-10907496, chr16:10907119-10907139, chr16:10907979-10907999 и chr16:10909138-10909158.

[00608] Вариант осуществления 29 представляет собой сконструированную клетку в соответствии с вариантами осуществления 24 или 25, в которой генетическая модификация включает по меньшей мере один нуклеотид экзона в пределах геномных координат, выбранных из: chr16:10906853-10906873, chr16:10906757-10906777, chr16:10895302-10895322, chr16:10907539-10907559, chr16:10907730-10907750, chr16:10895702-10895722.

[00609] Вариант осуществления 30 представляет собой сконструированную клетку в соответствии с любым из вариантов осуществления 24 или 25, в которой генетическая модификация включает по меньшей мере один нуклеотид экзона в пределах геномных координат, выбранных из: chr16:10906853-10906873, chr16:10922444-10922464 и chr16:10916432-10916452.

[00610] Вариант осуществления 31 представляет собой сконструированную клетку в соответствии с любым из вариантов осуществления 24-30, в которой генетическая модификация включает по меньшей мере 5 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат.

[00611] Вариант осуществления 32 представляет собой сконструированную клетку в соответствии с любым из вариантов осуществления 24-31, в которой генетическая модификация включает по меньшей мере 6, 7, 8, 9 или 10 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат.

[00612] Вариант осуществления 33 представляет собой сконструированную клетку в соответствии с любым из вариантов осуществления 24-32, в которой генетическая модификация содержит по меньшей мере одну замену C на T или по меньшей мере одну замену A на G в пределах геномных координат.

[00613] Вариант осуществления 34 представляет собой сконструированную клетку в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, в которой экспрессия MHC класса II снижена или устранена с помощью системы редактирования генов, которая связывается с геномной целевой последовательностью CIITA, содержащей по меньшей мере 5 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат выбранных из: chr16:10902662-10902682, chr16:10902723-10902743, chr16:10902729-10902749, chr16:10903747-10903767, chr16:10903824-10903844, chr16:10903824-10903844, chr16:10903848-10903868, chr16:10904761-10904781, chr16:10904764-10904784, chr16:10904765-10904785, chr16:10904785-10904805, chr16:10906542-10906562, chr16:10906556-10906576, chr16:10906609-10906629, chr16:10906610-10906630, chr16:10906616-10906636, chr16:10906682-10906702, chr16:10906756-10906776, chr16:10906757-10906777, chr16:10906757-10906777, chr16:10906821-10906841, chr16:10906823-10906843, chr16:10906847-10906867, chr16:10906848-10906868, chr16:10906853-10906873, chr16:10906853-10906873, chr16:10906904-10906924,

chr16:10906907-10906927, chr16:10906913-10906933, chr16:10906968-10906988, chr16:10906970-10906990, chr16:10906985-10907005, chr16:10907030-10907050, chr16:10907058-10907078, chr16:10907119-10907139, chr16:10907139-10907159, chr16:10907172-10907192, chr16:10907272-10907292, chr16:10907288-10907308, chr16:10907314-10907334, chr16:10907315-10907335, chr16:10907325-10907345, chr16:10907363-10907383, chr16:10907384-10907404, chr16:10907385-10907405, chr16:10907433-10907453, chr16:10907434-10907454, chr16:10907435-10907455, chr16:10907441-10907461, chr16:10907454-10907474, chr16:10907461-10907481, chr16:10907476-10907496, chr16:10907539-10907559, chr16:10907586-10907606, chr16:10907589-10907609, chr16:10907621-10907641, chr16:10907622-10907642, chr16:10907623-10907643, chr16:10907730-10907750, chr16:10907731-10907751, chr16:10907757-10907777, chr16:10907781-10907801, chr16:10907787-10907807, chr16:10907790-10907810, chr16:10907810-10907830, chr16:10907820-10907840, chr16:10907870-10907890, chr16:10907886-10907906, chr16:10907924-10907944, chr16:10907928-10907948, chr16:10907932-10907952, chr16:10907935-10907955, chr16:10907978-10907998, chr16:10907979-10907999, chr16:10908069-10908089, chr16:10908073-10908093, chr16:10908101-10908121, chr16:10909056-10909076, chr16:10909138-10909158, chr16:10910195-10910215, chr16:10910196-10910216, chr16:10915592-10915612, chr16:10915626-10915646, chr16:10916375-10916395, chr16:10916382-10916402, chr16:10916426-10916446, chr16:10916432-10916452, chr16:10918486-10918506, chr16:10918492-10918512, chr16:10918493-10918513, chr16:10922435-10922455, chr16:10922441-10922461, chr16:10922441-10922461, chr16:10922444-10922464, chr16:10922460-10922480, chr16:10923257-10923277 и chr16:10923265-10923285.

[00614] Вариант осуществления 35 представляет собой сконструированную клетку в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, в которой экспрессия MHC класса II снижена или устранена с помощью системы редактирования генов, которая связывается с геномной целевой последовательностью CIITA, содержащей по меньшей мере 5 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат, выбранных из: chr16:10906542-10906562, chr16:10906556-10906576, chr16:10906609-10906629, chr16:10906610-10906630, chr16:10906616-10906636, chr16:10906682-10906702, chr16:10906756-10906776, chr16:10906757-10906777, chr16:10906757-10906777, chr16:10906821-10906841, chr16:10906823-10906843, chr16:10906847-10906867, chr16:10906848-10906868, chr16:10906853-10906873, chr16:10906853-10906873, chr16:10906904-10906924, chr16:10906907-10906927, chr16:10906913-10906933, chr16:10906968-10906988, chr16:10906970-10906990, chr16:10906985-10907005, chr16:10907030-10907050, chr16:10907058-10907078, chr16:10907119-10907139, chr16:10907139-10907159, chr16:10907172-10907192, chr16:10907272-10907292, chr16:10907288-10907308, chr16:10907314-10907334, chr16:10907315-10907335, chr16:10907325-10907345, chr16:10907363-10907383, chr16:10907384-10907404,

chr16:10907385-10907405, chr16:10907433-10907453, chr16:10907434-10907454, chr16:10907435-10907455, chr16:10907441-10907461, chr16:10907454-10907474, chr16:10907461-10907481, chr16:10907476-10907496, chr16:10907539-10907559, chr16:10907586-10907606, chr16:10907589-10907609, chr16:10907621-10907641, chr16:10907622-10907642, chr16:10907623-10907643, chr16:10907730-10907750, chr16:10907731-10907751, chr16:10907757-10907777, chr16:10907781-10907801, chr16:10907787-10907807, chr16:10907790-10907810, chr16:10907810-10907830, chr16:10907820-10907840, chr16:10907870-10907890, chr16:10907886-10907906, chr16:10907924-10907944, chr16:10907928-10907948, chr16:10907932-10907952, chr16:10907935-10907955, chr16:10907978-10907998, chr16:10907979-10907999, chr16:10908069-10908089, chr16:10908073-10908093, chr16:10908101-10908121, chr16:10909056-10909076, chr16:10909138-10909158, chr16:10910195-10910215, chr16:10910196-10910216, chr16:10915592-10915612, chr16:10915626-10915646, chr16:10916375-10916395, chr16:10916382-10916402, chr16:10916426-10916446, chr16:10916432-10916452, chr16:10918486-10918506, chr16:10918492-10918512, chr16:10918493-10918513, chr16:10922435-10922455, chr16:10922441-10922461, chr16:10922441-10922461, chr16:10922444-10922464, chr16:10922460-10922480, chr16:10923257-10923277 и chr16:10923265-10923285.

[00615] Вариант осуществления 36 представляет собой сконструированную клетку в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, в которой экспрессия MHC класса II снижена или устранена с помощью системы редактирования генов, которая связывается с геномной последовательностью-мишенью CIITA, содержащей по меньшей мере 5 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат, выбранных из: chr16:10906542-10906562, chr16:10906556-10906576, chr16:10906609-10906629, chr16:10906610-10906630, chr16:10906616-10906636, chr16:10906682-10906702, chr16:10906756-10906776, chr16:10906757-10906777, chr16:10906757-10906777, chr16:10906821-10906841, chr16:10906823-10906843, chr16:10906847-10906867, chr16:10906848-10906868, chr16:10906853-10906873, chr16:10906853-10906873, chr16:10906904-10906924, chr16:10906907-10906927, chr16:10906913-10906933, chr16:10906968-10906988, chr16:10906970-10906990, chr16:10906985-10907005, chr16:10907030-10907050, chr16:10907058-10907078, chr16:10907119-10907139, chr16:10907139-10907159, chr16:10907172-10907192, chr16:10907272-10907292, chr16:10907288-10907308, chr16:10907314-10907334, chr16:10907315-10907335, chr16:10907325-10907345, chr16:10907363-10907383, chr16:10907384-10907404, chr16:10907385-10907405, chr16:10907433-10907453, chr16:10907434-10907454, chr16:10907435-10907455, chr16:10907441-10907461, chr16:10907454-10907474, chr16:10907461-10907481, chr16:10907476-10907496, chr16:10907539-10907559, chr16:10907586-10907606, chr16:10907589-10907609, chr16:10907621-10907641, chr16:10907622-10907642, chr16:10907623-10907643, chr16:10907730-10907750, chr16:10907731-10907751, chr16:10907757-10907777, chr16:10907781-10907801,

chr16:10907787-10907807, chr16:10907790-10907810, chr16:10907810-10907830, chr16:10907820-10907840, chr16:10907870-10907890, chr16:10907886-10907906, chr16:10907924-10907944, chr16:10907928-10907948, chr16:10907932-10907952, chr16:10907935-10907955, chr16:10907978-10907998, chr16:10907979-10907999, chr16:10908069-10908089, chr16:10908073-10908093 и chr16:10908101-10908121.

[00616] Вариант осуществления 37 представляет собой сконструированную клетку в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, в которой экспрессия MHC класса II снижена или устранена с помощью системы редактирования генов, которая связывается с геномной целевой последовательностью CIITA, содержащей по меньшей мере 5 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат, выбранных из: chr16:10916432-10916452, chr16:10922444-10922464, chr16:10907924-10907944, chr16:10906985-10907005, chr16:10908073-10908093, chr16:10907433-10907453, chr16:10907979-10907999, chr16:10907139-10907159, chr16:10922435-10922455, chr16:10907384-10907404, chr16:10907434-10907454, chr16:10907119-10907139, chr16:10907539-10907559, chr16:10907810-10907830, chr16:10907315-10907335, chr16:10916426-10916446, chr16:10909138-10909158, chr16:10908101-10908121, chr16:10907790-10907810, chr16:10907787-10907807, chr16:10907454-10907474, chr16:10895702-10895722, chr16:10902729-10902749, chr16:10918492-10918512, chr16:10907932-10907952, chr16:10907623-10907643, chr16:10907461-10907481, chr16:10902723-10902743, chr16:10907622-10907642, chr16:10922441-10922461, chr16:10902662-10902682, chr16:10915626-10915646, chr16:10915592-10915612, chr16:10907385-10907405, chr16:10907030-10907050, chr16:10907935-10907955, chr16:10906853-10906873, chr16:10906757-10906777, chr16:10907730-10907750 и chr16:10895302-10895322.

[00617] Вариант осуществления 38 представляет собой сконструированную клетку в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, в которой экспрессия MHC класса II снижена или устранена с помощью системы редактирования генов, которая связывается с геномной целевой последовательностью CIITA, содержащей по меньшей мере 5 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат, выбранных из: chr16:10907539-10907559, chr16:10916426-10916446, chr16:10906907-10906927, chr16:10895702-10895722, chr16:10907757-10907777, chr16:10907623-10907643, chr16:10915626-10915646, chr16:10906756-10906776, chr16:10907476-10907496, chr16:10907385-10907405 и chr16:10923265-10923285.

[00618] Вариант осуществления 39 представляет собой сконструированную клетку в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, в которой экспрессия MHC класса II снижена или устранена с помощью системы редактирования генов, которая связывается с геномной целевой последовательностью CIITA, содержащей по меньшей мере 5 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат, выбранных из: chr16:10906853-10906873, chr16:10922444-10922464, chr16:10907924-10907944, chr16:10907315-10907335, chr16:10916432-10916452, chr16:10907932-10907952,

chr16:10915626-10915646, chr16:10907586-10907606, chr16:10916426-10916446, chr16:10907476-10907496, chr16:10907787-10907807, chr16:10907979-10907999, chr16:10906904-10906924 и chr16:10909138-10909158.

[00619] Вариант осуществления 40 представляет собой сконструированную клетку в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, в которой экспрессия MHC класса II снижена или устранена с помощью системы редактирования генов, которая связывается с геномной целевой последовательностью CIITA, содержащей по меньшей мере 5 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат выбранных из: chr16:10895702-10895722, chr16:10916432-10916452, chr16:10907623-10907643, chr16:10907932-10907952, chr16:10906985-10907005, chr16:10915626-10915646, chr16:10907539-10907559, chr16:10916426-10916446, chr16:10907476-10907496, chr16:10907119-10907139, chr16:10907979-10907999 и chr16:10909138-10909158.

[00620] Вариант осуществления 41 представляет собой сконструированную клетку в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, в которой экспрессия MHC класса II снижена или устранена с помощью системы редактирования генов, которая связывается с геномной целевой последовательностью CIITA, содержащей по меньшей мере 5 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат, выбранных из: chr16:10906853-10906873, chr16:10906757-10906777, chr16:10895302-10895322, chr16:10907539-10907559, chr16:10907730-10907750 и chr16:10895702-10895722.

[00621] Вариант осуществления 42 представляет собой сконструированную клетку в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, в которой экспрессия MHC класса II снижена или устранена с помощью системы редактирования генов, которая связывается с геномной целевой последовательностью CIITA, содержащей по меньшей мере 5 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат, выбранных из: chr16:10906853-10906873, chr16:10922444-10922464 и chr16:10916432-10916452.

[00622] Вариант осуществления 43 представляет собой сконструированную клетку в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, в которой экспрессия MHC класса II снижена или устранена с помощью системы редактирования генов, которая связывается с геномной целевой последовательностью CIITA, содержащей по меньшей мере 5 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат chr16: 10916426-10916446.

[00623] Вариант осуществления 44 представляет собой сконструированную клетку в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, в которой экспрессия MHC класса II снижена или устранена с помощью системы редактирования генов, которая связывается с геномной целевой последовательностью CIITA, содержащей по меньшей мере 5 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат chr16: 10906907-10906927.

[00624] Вариант осуществления 45 представляет собой сконструированную клетку в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, в которой экспрессия MHC класса II снижена или устранена с помощью системы редактирования генов, которая связывается с геномной целевой последовательностью CIITA, содержащей по меньшей мере 5 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат chr16: 10907757-10907777.

[00625] Вариант осуществления 46 представляет собой сконструированную клетку в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, в которой экспрессия MHC класса II снижена или устранена с помощью системы редактирования генов, которая связывается с геномной целевой последовательностью CIITA, содержащей по меньшей мере 5 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат chr16:10907623-10907643.

[00626] Вариант осуществления 47 представляет собой сконструированную клетку в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, в которой экспрессия MHC класса II снижена или устранена с помощью системы редактирования генов, которая связывается с геномной целевой последовательностью CIITA, содержащей по меньшей мере 5 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат chr16: 10915626-10915646.

[00627] Вариант осуществления 48 представляет собой сконструированную клетку в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, в которой экспрессия MHC класса II снижена или устранена с помощью системы редактирования генов, которая связывается с геномной целевой последовательностью CIITA, содержащей по меньшей мере 5 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат chr16: 10906756-10906776.

[00628] Вариант осуществления 49 представляет собой сконструированную клетку в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, в которой экспрессия MHC класса II снижена или устранена с помощью системы редактирования генов, которая связывается с геномной целевой последовательностью CIITA, содержащей по меньшей мере 5 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат chr16:10907385-10907405.

[00629] Вариант осуществления 50 представляет собой сконструированную клетку в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, в которой экспрессия MHC класса II снижена или устранена с помощью системы редактирования генов, которая связывается с геномной целевой последовательностью CIITA, содержащей по меньшей мере 5 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат chr16: 10923265-10923285.

[00630] Вариант осуществления 51 представляет собой сконструированную клетку в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, в которой экспрессия MHC класса II снижена или устранена с помощью системы редактирования генов, которая связывается с геномной целевой последовательностью CIITA, содержащей по меньшей мере 5 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат chr16:10906853-10906873.

[00631] Вариант осуществления 52 представляет собой сконструированную клетку в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, в которой экспрессия MHC класса II снижена устранена с помощью системы редактирования генов, которая связывается с геномной целевой последовательностью CIITA, содержащей по меньшей мере 5 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат chr16:10922444-10922464.

[00632] Вариант осуществления 53 представляет собой сконструированную клетку в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, в которой экспрессия MHC класса II снижена или устранена с помощью системы редактирования генов, которая связывается с геномной целевой последовательностью CIITA, содержащей по меньшей мере 5 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат chr16:10916432-10916452.

[00633] Вариант осуществления 54 представляет собой сконструированную клетку в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, в которой экспрессия MHC класса II снижена или устранена с помощью системы редактирования генов, которая связывается с геномной целевой последовательностью CIITA, содержащей по меньшей мере 5 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат chr16:10906757-10906777.

[00634] Вариант осуществления 55 представляет собой сконструированную клетку в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, в которой экспрессия MHC класса II снижена или устранена с помощью системы редактирования генов, которая связывается с геномной целевой последовательностью CIITA, содержащей по меньшей мере 5 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат chr16:10895302-10895322.

[00635] Вариант осуществления 56 представляет собой сконструированную клетку в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, в которой экспрессия MHC класса II снижена или устранена с помощью системы редактирования генов, которая связывается с геномной целевой последовательностью CIITA, содержащей по меньшей мере 5 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат chr16:10907539-10907559.

[00636] Вариант осуществления 57 представляет собой сконструированную клетку в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, в которой экспрессия MHC класса II снижена или устранена с помощью системы редактирования генов, которая связывается с геномной целевой последовательностью CIITA, содержащей по меньшей мере 5 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат chr16:10907730-10907750.

[00637] Вариант осуществления 58 представляет собой сконструированную клетку в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, в которой экспрессия MHC класса II снижена или устранена с помощью системы редактирования генов, которая связывается с геномной целевой последовательностью CIITA, содержащей по меньшей мере 5 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат chr16:10895702-10895722.

[00638] Вариант осуществления 59 представляет собой сконструированную клетку в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, в которой экспрессия MHC класса II снижена или устранена с помощью системы редактирования генов, которая связывается с геномной целевой последовательностью CIITA, содержащей по меньшей мере 5 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат chr16:10907932-10907952.

[00639] Вариант осуществления 60 представляет собой сконструированную клетку в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, в которой экспрессия MHC класса II снижена или устранена с помощью системы редактирования генов, которая связывается с геномной целевой последовательностью CIITA, содержащей по меньшей мере 5 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат chr16:10907476-10907496.

[00640] Вариант осуществления 61 представляет собой сконструированную клетку в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, в которой экспрессия MHC класса II снижена или устранена с помощью системы редактирования генов, которая связывается с геномной целевой последовательностью CIITA, содержащей по меньшей мере 5 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат chr16:10909138-10909158.

[00641] Вариант осуществления 62 представляет собой сконструированную клетку в соответствии с любым из вариантов осуществления 34-61, в которой геномная целевая последовательность CIITA включает по меньшей мере 10 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат.

[00642] Вариант осуществления 63 представляет собой сконструированную клетку в соответствии с любым из вариантов осуществления 34-62, в которой геномная целевая последовательность CIITA включает по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат.

[00643] Вариант осуществления 64 представляет собой сконструированную клетку в соответствии с любым из вариантов осуществления 34-63, в которой система редактирования генов содержит РНК-направляемый ДНК-связывающий агент.

[00644] Вариант осуществления 65 представляет собой сконструированную клетку по варианту осуществления 64, в которой РНК-направляемый ДНК-связывающий агент содержит белок Cas9, такой как Cas9 S. pyogenes.

[00645] Вариант осуществления 66 представляет собой сконструированную клетку в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, в которой сконструированная клетка дополнительно имеет сниженную или устраненную поверхностную экспрессию MHC класса I.

[00646] Вариант осуществления 67 представляет собой сконструированную клетку по варианту осуществления 66, причем сконструированная клетка содержит генетическую модификацию гена бета-2-микроглобулина (B2M).

[00647] Вариант осуществления 68 представляет собой сконструированную клетку по варианту осуществления 66, причем сконструированная клетка содержит генетическую модификацию гена HLA-A.

[00648] Вариант осуществления 69 представляет собой сконструированную клетку по любому из предыдущих вариантов осуществления, в которой сконструированная клетка дополнительно содержит экзогенную нуклеиновую кислоту.

[00649] Вариант осуществления 70 представляет собой сконструированную клетку в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, в которой сконструированная клетка содержит экзогенную нуклеиновую кислоту, кодирующую нацеливающий рецептор, который экспрессируется на поверхности сконструированной клетки.

[00650] Вариант осуществления 71 представляет собой сконструированную клетку по варианту осуществления 70, в которой нацеливающий рецептор представляет собой CAR.

[00651] Вариант осуществления 72 представляет собой сконструированную клетку по варианту осуществления 70, в которой нацеливающий рецептор представляет собой TCR.

[00652] Вариант осуществления 73 представляет собой сконструированную клетку по варианту осуществления 70, в которой нацеливающий рецептор представляет собой

TCR WT1.

[00653] Вариант осуществления 74 представляет собой сконструированную клетку по любому из предыдущих вариантов осуществления, в которой сконструированная клетка дополнительно содержит экзогенную нуклеиновую кислоту, кодирующую полипептид, который секретируется сконструированной клеткой.

[00654] Вариант осуществления 75 представляет собой сконструированную клетку в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающуюся тем, что сконструированная клетка представляет собой иммунную клетку.

[00655] Вариант осуществления 76 представляет собой сконструированную клетку по любому из предыдущих вариантов осуществления, при этом сконструированная клетка представляет собой моноцит, макрофаг, тучную клетку, дендритную клетку или гранулоцит.

[00656] Вариант осуществления 77 представляет собой сконструированную клетку по любому из предыдущих вариантов осуществления, при этом сконструированная клетка представляет собой лимфоцит.

[00657] Вариант осуществления 78 представляет собой сконструированную клетку по варианту осуществления 77, при этом сконструированная клетка представляет собой Т-клетку.

[00658] Вариант осуществления 79 представляет собой сконструированную клетку по варианту осуществления 78, при этом сконструированная клетка дополнительно имеет сниженную или устраненную экспрессию белка эндогенного Т-клеточного рецептора (TCR) по сравнению с немодифицированной клеткой.

[00659] Вариант осуществления 80 представляет собой сконструированную клетку в соответствии с любым из вариантов осуществления 78-79, в которой клетка имеет сниженную или устраненную экспрессию белка TRAC по сравнению с немодифицированной клеткой.

[00660] Вариант осуществления 81 представляет собой сконструированную клетку в соответствии с любым из вариантов осуществления 78-80, в которой клетка имеет сниженную экспрессию белка TRBC по сравнению с немодифицированной клеткой.

[00661] Вариант осуществления 82 представляет собой фармацевтическую композицию, содержащую сконструированную клетку в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления.

[00662] Вариант осуществления 83 представляет собой популяцию клеток, содержащую сконструированную клетку по любому из предыдущих вариантов осуществления.

[00663] Вариант осуществления 84 представляет собой фармацевтическую композицию, содержащую популяцию клеток, при этом популяция клеток включают клетку по любому из предыдущих вариантов осуществления.

[00664] Вариант осуществления 85 представляет собой популяцию клеток по варианту осуществления 83 или фармацевтическую композицию по варианту

осуществления 84, при этом популяция клеток по меньшей мере на 65% является отрицательной по MHC класса II, как измерено с помощью проточной цитометрии.

[00665] Вариант осуществления 86 представляет собой популяцию клеток по варианту осуществления 83 или фармацевтическую композицию по варианту осуществления 84, при этом популяция клеток по меньшей мере на 70% является отрицательной по MHC класса II, как измерено с помощью проточной цитометрии.

[00666] Вариант осуществления 87 представляет собой популяцию клеток по варианту осуществления 83 или фармацевтическую композицию по варианту осуществления 84, при этом популяция клеток по меньшей мере на 80% является отрицательной по MHC класса II, как измерено с помощью проточной цитометрии.

[00667] Вариант осуществления 88 представляет собой популяцию клеток по варианту осуществления 83 или фармацевтическую композицию по варианту осуществления 84, при этом популяция клеток по меньшей мере на 90% является отрицательной по MHC класса II, как измерено с помощью проточной цитометрии.

[00668] Вариант осуществления 89 представляет собой популяцию клеток по варианту осуществления 83 или фармацевтическую композицию по варианту осуществления 84, при этом популяция клеток по меньшей мере на 92% является отрицательной по MHC класса II, как измерено с помощью проточной цитометрии.

[00669] Вариант осуществления 90 представляет собой популяцию клеток по варианту осуществления 83 или фармацевтическую композицию по варианту осуществления 84, при этом популяция клеток по меньшей мере на 93% является отрицательной по MHC класса II, как измерено с помощью проточной цитометрии.

[00670] Вариант осуществления 91 представляет собой популяцию клеток по варианту осуществления 83 или фармацевтическую композицию по варианту осуществления 84, при этом популяция клеток по меньшей мере на 94% является отрицательной по MHC класса II, как измерено с помощью проточной цитометрии.

[00671] Вариант осуществления 92 представляет собой популяцию клеток по варианту осуществления 83 или фармацевтическую композицию по варианту осуществления 84, при этом популяция клеток по меньшей мере на 95% является отрицательной по MHC класса II, как измерено с помощью проточной цитометрии.

[00672] Вариант осуществления 93 представляет собой популяцию клеток по варианту осуществления 83 или фармацевтическую композицию по варианту осуществления 84, при этом популяция клеток по меньшей мере на 96% является отрицательной по MHC класса II, как измерено с помощью проточной цитометрии.

[00673] Вариант осуществления 94 представляет собой популяцию клеток по варианту осуществления 83 или фармацевтическую композицию по варианту осуществления 84, при этом популяция клеток по меньшей мере на 97% является отрицательной по MHC класса II, как измерено с помощью проточной цитометрии.

[00674] Вариант осуществления 95 представляет собой популяцию клеток по варианту осуществления 83 или фармацевтическую композицию по варианту

осуществления 84, при этом популяция клеток по меньшей мере на 98% является отрицательной по MHC класса II, как измерено с помощью проточной цитометрии.

[00675] Вариант осуществления 96 представляет собой популяцию клеток по варианту осуществления 83 или фармацевтическую композицию по варианту осуществления 84, при этом популяция клеток по меньшей мере на 99% является отрицательной по MHC класса II, как измерено с помощью проточной цитометрии.

[00676] Вариант осуществления 97 представляет собой популяцию клеток или фармацевтическую композицию по любому из вариантов осуществления 83-96, при этом популяция клеток по меньшей мере на 95% является отрицательной по эндогенному белку TCR, как измерено с помощью проточной цитометрии.

[00677] Вариант осуществления 98 представляет собой популяцию клеток или фармацевтическую композицию по любому из вариантов осуществления 83-96, при этом популяция клеток по меньшей мере на 97% является отрицательной по эндогенному белку TCR, как измерено с помощью проточной цитометрии.

[00678] Вариант осуществления 99 представляет собой популяцию клеток или фармацевтическую композицию по любому из вариантов осуществления 83-96, при этом популяция клеток по меньшей мере на 98% является отрицательной по эндогенному белку TCR, как измерено с помощью проточной цитометрии.

[00679] Вариант осуществления 100 представляет собой популяцию клеток или фармацевтическую композицию по любому из вариантов осуществления 83-96, при этом популяция клеток по меньшей мере на 99% является отрицательной по эндогенному белку TCR, как измерено с помощью проточной цитометрии.

[00680] Вариант осуществления 101 представляет собой способ введения сконструированной клетки, популяции клеток или фармацевтической композиции в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления субъекту, нуждающемуся в этом.

[00681] Вариант осуществления 102 представляет собой способ введения сконструированной клетки, популяции клеток или фармацевтической композиции в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления субъекту в качестве терапии на основе адоптивного переноса клеток (АПК).

[00682] Вариант осуществления 103 представляет собой способ создания сконструированной клетки, в которой снижена или устранена поверхностная экспрессия белка MHC класса II по сравнению с немодифицированной клеткой, включающий приведение клетки в контакт с композицией, содержащей: (a) CIITA-направленную РНК, содержащую (i) направляющую последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1-117; (ii) по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 последовательных нуклеотидов последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 1-117; (iii) направляющей последовательности, на по меньшей мере 95%, 90% или 85% идентичной последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 1-117; (iv) последовательности, которая содержит 10 последовательных нуклеотидов ±10 нуклеотидов геномной координаты, указанной в Таблице 2; (v) по меньшей мере 17, 18, 19

или 20 последовательных нуклеотидов последовательности из (iv) или (vi) направляющей последовательности, которая на по меньшей мере 95%, 90% или 85% идентична последовательности, выбранной из (v); и, (b) необязательно, РНК-направляемый ДНК-связывающий агент или нуклеиновую кислоту, кодирующую РНК-направляемый ДНК-связывающий агент.

[00683] Вариант осуществления 104 представляет собой способ снижения или устранения поверхностной экспрессии белка MHC класса II в сконструированной клетке по сравнению с немодифицированной клеткой, включающий приведение клетки в контакт с композицией, содержащей: (a) CIITA-направленную РНК, содержащую (i) направляющую последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1-117; (ii) по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 последовательных нуклеотидов последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 1-117; (iii) направляющей последовательности, на по меньшей мере 95%, 90% или 85% идентичной последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 1-117; (iv) последовательности, которая содержит 10 последовательных нуклеотидов ±10 нуклеотидов геномной координаты, указанной в Таблице 2; (v) по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 последовательных нуклеотидов последовательности из (iv) или (vi) направляющей последовательности, которая на по меньшей мере 95%, 90% или 85% идентична последовательности, выбранной из (v); и, (b) необязательно, РНК-направляемый ДНК-связывающий агент или нуклеиновую кислоту, кодирующую РНК-направляемый ДНК-связывающий агент.

[00684] Вариант осуществления 105 представляет собой способ согласно варианту осуществления 103 или 104, в котором CIITA-направленная РНК содержит (i) направляющую последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 32, 64, 67, 68, 74, 76, 84, 86, 90, 91 и 115; (ii) по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 последовательных нуклеотидов последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 32, 64, 67, 68, 74, 76, 84, 86, 90, 91 и 115; или (iii) направляющей последовательности, на по меньшей мере 95%, 90% или 85% идентичной последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 32, 64, 67, 68, 74, 76, 84, 86, 90, 91 и 115.

[00685] Вариант осуществления 106 представляет собой способ по любому из вариантов осуществления 103-105, дополнительно включающий снижение или устранение поверхностной экспрессии белка MHC класса I в клетке по сравнению с немодифицированной клеткой.

[00686] Вариант осуществления 107 представляет собой способ по любому из вариантов осуществления 103-106, дополнительно включающий снижение или устранение поверхностной экспрессии белка B2M в клетке по сравнению с немодифицированной клеткой.

[00687] Вариант осуществления 108 представляет собой способ по любому из вариантов осуществления 103-107, дополнительно включающий снижение или устранение поверхностной экспрессии белка HLA-A в клетке по сравнению с немодифицированной клеткой.

[00688] Вариант осуществления 109 представляет собой способ по любому из вариантов осуществления 103-108, дополнительно включающий снижение или устранение поверхностной экспрессии белка TCR в клетке по сравнению с немодифицированной клеткой.

[00689] Вариант осуществления 110 представляет собой способ по любому из вариантов осуществления 103-109, дополнительно включающий приведение клетки в контакт с экзогенной нуклеиновой кислотой.

[00690] Вариант осуществления 111 представляет собой способ по любому из вариантов осуществления 103- 110, дополнительно включающий приведение клетки в контакт с ингибитором ДНК-зависимой протеинкиназы (ДНКРКi).

[00691] Вариант осуществления 112 представляет собой способ по варианту осуществления 111, где ДНКРКi представляет собой Соединение 1.

[00692] Вариант осуществления 113 представляет собой способ по варианту осуществления 110, дополнительно включающий приведение клетки в контакт с экзогенной нуклеиновой кислотой, кодирующей нацеливающий рецептор.

[00693] Вариант осуществления 114 представляет собой способ в соответствии с вариантом осуществления 110, дополнительно включающий приведение клетки в контакт с экзогенной нуклеиновой кислотой, кодирующей полипептид, секретируемый клеткой.

[00694] Вариант осуществления 115 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ по любому из предыдущих вариантов осуществления, где клетка представляет собой аллогенную клетку.

[00695] Вариант осуществления 116 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающихся тем, что клетка представляет собой клетку человека.

[00696] Вариант осуществления 117 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ по любому из предыдущих вариантов осуществления, где клетка представляет собой первичную клетку.

[00697] Вариант осуществления 118 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ по любому из предыдущих вариантов осуществления, где клетка представляет собой Т-клетку CD4+.

[00698] Вариант осуществления 119 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ по любому из предыдущих вариантов осуществления, где клетка представляет собой Т-клетку CD8+.

[00699] Вариант осуществления 120 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ по любому из предыдущих вариантов осуществления, где клетка представляет собой Т-клетку памяти.

[00700] Вариант осуществления 121 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ по любому из

предыдущих вариантов осуществления, где клетка представляет собой В-клетку.

[00701] Вариант осуществления 122 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ по любому из предыдущих вариантов осуществления, где клетка представляет собой плазматическую В-клетку.

[00702] Вариант осуществления 123 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ по любому из предыдущих вариантов осуществления, где клетка представляет собой В-клетку памяти.

[00703] Вариант осуществления 124 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ по любому из предыдущих вариантов осуществления, где клетка представляет собой гемопоэтическую стволовую клетку (ГСК).

[00704] Вариант осуществления 125 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ по любому из предыдущих вариантов осуществления, где клетка представляет собой активированную клетку.

[00705] Вариант осуществления 126 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ по любому из предыдущих вариантов осуществления, при этом клетка представляет собой неактивированную клетку.

[00706] Вариант осуществления 127 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ по любому из предыдущих вариантов осуществления, включающие экзогенную нуклеиновую кислоту или приведение клетки в контакт с экзогенной нуклеиновой кислотой, где экзогенная нуклеиновая кислота кодирует молекулу ингибитора NK-клеток.

[00707] Вариант осуществления 128 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, включающие экзогенную нуклеиновую кислоту или приведение клетки в контакт с экзогенной нуклеиновой кислотой, где экзогенная нуклеиновая кислота кодирует молекулу ингибитора NK-клеток, при этом молекула ингибитора NK-клетки связывается с ингибирующим рецептором на NK-клетке.

[00708] Вариант осуществления 129 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ по любому из предыдущих вариантов осуществления, включающие экзогенную нуклеиновую кислоту или приведение клетки в контакт с экзогенной нуклеиновой кислотой, где экзогенная нуклеиновая кислота кодирует молекулу ингибитора NK-клеток, при этом молекула ингибитора NK-клеток связывается с NKG2A на NK-клетке.

[00709] Вариант осуществления 130 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ по любому из предыдущих вариантов осуществления, включающие экзогенную нуклеиновую кислоту

или приведение клетки в контакт с экзогенной нуклеиновой кислотой, где экзогенная нуклеиновая кислота кодирует молекулу ингибитора NK-клеток, при этом молекула ингибитора NK-клеток представляет собой неклассическую молекулу MHC класса I.

[00710] Вариант осуществления 131 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, включающие экзогенную нуклеиновую кислоту или приведение клетки в контакт с экзогенной нуклеиновой кислотой, где экзогенная нуклеиновая кислота кодирует молекулу ингибитора NK-клеток, при этом молекула ингибитора NK-клеток представляет собой HLA-E.

[00711] Вариант осуществления 132 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ по любому из предыдущих вариантов осуществления, включающие экзогенную нуклеиновую кислоту или приведение клетки в контакт с экзогенной нуклеиновой кислотой, где экзогенная нуклеиновая кислота кодирует молекулу ингибитора NK-клеток, при этом молекула ингибитора NK-клеток представляет собой слитый белок.

[00712] Вариант осуществления 133 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ по любому из предыдущих вариантов осуществления, включающие экзогенную нуклеиновую кислоту или приведение клетки в контакт с экзогенной нуклеиновой кислотой, где экзогенная нуклеиновая кислота кодирует молекулу ингибитора NK-клеток, при этом молекула ингибитора NK-клеток представляет собой слитый белок, содержащий HLA-E и B2M.

[00713] Вариант осуществления 134 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ по любому из предыдущих вариантов осуществления, включающие экзогенную нуклеиновую кислоту, кодирующую полипептид, который секретируется клеткой, или приведение клетки в контакт с указанной экзогенной нуклеиновой кислотой, где секретируемый полипептид представляет собой антитело или фрагмент антитела.

[00714] Вариант осуществления 135 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, включающие экзогенную нуклеиновую кислоту, кодирующую полипептид, который секретируется клеткой, или приведение клетки в контакт с указанной экзогенной нуклеиновой кислотой, где секретируемый полипептид представляет собой полноразмерное антитело IgG.

[00715] Вариант осуществления 136 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, включающие экзогенную нуклеиновую кислоту, кодирующую полипептид, который секретируется клеткой, или приведение клетки в контакт с указанной экзогенной нуклеиновой кислотой, где секретируемый полипептид представляет собой одноцепочечное антитело.

[00716] Вариант осуществления 137 представляет собой сконструированную

клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ по любому из предыдущих вариантов осуществления, включающие экзогенную нуклеиновую кислоту, кодирующую полипептид, который секретируется клеткой, или приведение клетки в контакт с указанной экзогенной нуклеиновой кислотой, где секретируемый полипептид представляет собой нейтрализующее антитело.

[00717] Вариант осуществления 138 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, включающие экзогенную нуклеиновую кислоту, кодирующую полипептид, который секретируется клеткой, или приведение клетки в контакт с указанной экзогенной нуклеиновой кислотой, где секретируемый полипептид представляет собой фермент.

[00718] Вариант осуществления 139 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ по любому из предыдущих вариантов осуществления, включающие экзогенную нуклеиновую кислоту, кодирующую полипептид, который секретируется клеткой, или приведение клетки в контакт с указанной экзогенной нуклеиновой кислотой, где секретируемый полипептид представляет собой цитокин.

[00719] Вариант осуществления 140 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ по любому из предыдущих вариантов осуществления, включающие экзогенную нуклеиновую кислоту, кодирующую Слитые белки который секретируется клеткой, или приведение клетки в контакт с указанной экзогенной нуклеиновой кислотой, где секретируемый полипептид представляет собой слитый белок.

[00720] Вариант осуществления 141 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ по любому из предыдущих вариантов осуществления, включающие экзогенную нуклеиновую кислоту, кодирующую полипептид, который секретируется клеткой, или приведение клетки в контакт с указанной экзогенной нуклеиновой кислотой, где секретируемый полипептид содержит растворимый рецептор. Сконструированная клетка, популяция клеток, фармацевтическая композиция или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, включающие экзогенную нуклеиновую кислоту, кодирующую нацеливающий рецептор, или приведение клетки в контакт с экзогенной нуклеиновой кислотой, кодирующей нацеливающий рецептор, при этом нацеливающий рецептор представляет собой Т-клеточный рецептор (TCR).

[00721] Вариант осуществления 142 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, включающие экзогенную нуклеиновую кислоту, кодирующую нацеливающий рецептор, или приведение клетки в контакт с экзогенной нуклеиновой кислотой, кодирующей нацеливающий рецептор, при этом нацеливающий рецептор представляет собой генетически модифицированный TCR.

[00722] Вариант осуществления 143 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, включающие экзогенную нуклеиновую кислоту, кодирующую нацеливающий рецептор, или приведение клетки в контакт с экзогенной нуклеиновой кислотой, кодирующей нацеливающий рецептор, при этом нацеливающий рецептор представляет собой WT1 TCR.

[00723] Вариант осуществления 144 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, включающие экзогенную нуклеиновую кислоту, кодирующую нацеливающий рецептор, или приведение клетки в контакт с экзогенной нуклеиновой кислотой, кодирующей нацеливающий рецептор, при этом нацеливающий рецептор представляет собой CAR.

[00724] Вариант осуществления 145 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, где CIITA-направленная РНК вводится в клетку в векторе.

[00725] Вариант осуществления 146 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, где РНК-направляемый ДНК-связывающий агент для CIITA вводится в клетку в векторе, необязательно в том же векторе, что и CIITA-направленная РНК.

[00726] Вариант осуществления 147 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, при этом экзогенная нуклеиновая кислота вводится в клетку в векторе.

[00727] Вариант осуществления 148 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающиеся тем, что вектор представляет собой вирусный вектор.

[00728] Вариант осуществления 149 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающиеся тем, что вектор представляет собой лентивирусный вектор.

[00729] Вариант осуществления 150 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающиеся тем, что вектор представляет собой AAV.

[00730] Вариант осуществления 151 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающиеся тем, что вектор

представляет собой невирусный вектор.

[00731] Вариант осуществления 152 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, при этом компонент системы редактирования генов вводится в клетку в составной композиции липида и нуклеиновой кислоты.

[00732] Вариант осуществления 153 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, при этом направляющую РНК вводят в клетку в составной композиции липида и нуклеиновой кислоты, необязательно в той же составной композиции липида и нуклеиновой кислоты, что и РНК-направляемый ДНК-связывающий агент.

[00733] Вариант осуществления 154 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, при этом экзогенная нуклеиновая кислота вводится в клетку в составной композиции липида и нуклеиновой кислоты.

[00734] Вариант осуществления 155 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, где композицией сборки липидной нуклеиновой кислоты является липидная наночастица (LNP).

[00735] Вариант осуществления 156 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, при этом экзогенная нуклеиновая кислота интегрирована в геном клетки.

[00736] Вариант осуществления 157 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, при этом экзогенная нуклеиновая кислота интегрируется в геном клетки путем гомологичной рекомбинации (ГР).

[00737] Вариант осуществления 158 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, при этом экзогенная нуклеиновая интегрирована в безопасный локус в геноме клетки.

[00738] Вариант осуществления 159 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающиеся тем, что РНК, разработанная для направления на CIITA, содержит SEQ ID NO: 1.

[00739] Вариант осуществления 160 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающиеся тем, что РНК, разработанная для направления на CIITA, содержит SEQ ID NO: 2.

[00740] Вариант осуществления 161 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающиеся тем, что РНК, разработанная для направления на CIITA, содержит SEQ ID NO: 3.

[00741] Вариант осуществления 162 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающиеся тем, что РНК, разработанная для направления на CIITA, содержит SEQ ID NO: 4.

[00742] Вариант осуществления 163 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающиеся тем, что РНК, разработанная для направления на CIITA, содержит SEQ ID NO: 5.

[00743] Вариант осуществления 164 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающиеся тем, что РНК, разработанная для направления на CIITA, содержит SEQ ID NO: 6.

[00744] Вариант осуществления 165 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающиеся тем, что РНК, разработанная для направления на CIITA, содержит SEQ ID NO: 7.

[00745] Вариант осуществления 166 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающиеся тем, что РНК, разработанная для направления на CIITA, содержит SEQ ID NO: 8.

[00746] Вариант осуществления 167 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающиеся тем, что РНК, разработанная для направления на CIITA, содержит SEQ ID NO: 9.

[00747] Вариант осуществления 168 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающиеся тем, что РНК, разработанная для направления на CIITA, содержит SEQ ID NO: 10.

[00748] Вариант осуществления 169 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающиеся тем, что РНК, разработанная для направления на CIITA, содержит SEQ ID NO: 11.

[00749] Вариант осуществления 170 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающиеся тем, что РНК, разработанная для направления на CIITA, содержит SEQ ID NO: 12.

[00750] Вариант осуществления 171 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающиеся тем, что РНК, разработанная для направления на CIITA, содержит SEQ ID NO: 13.

[00751] Вариант осуществления 172 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающиеся тем, что РНК, разработанная для направления на CIITA, содержит SEQ ID NO: 14.

[00752] Вариант осуществления 173 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вар иантов осуществления, отличающиеся тем, что РНК, разработанная для направления на CIITA, содержит SEQ ID NO: 15.

[00753] Вариант осуществления 174 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающиеся тем, что РНК, разработанная для направления на CIITA, содержит SEQ ID NO: 16.

[00754] Вариант осуществления 175 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающиеся тем, что РНК, разработанная для направления на CIITA, содержит SEQ ID NO: 17.

[00755] Вариант осуществления 176 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающиеся тем, что РНК, разработанная для направления на CIITA, содержит SEQ ID NO: 18.

[00756] Вариант осуществления 177 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающиеся тем, что РНК, разработанная для направления на CIITA, содержит SEQ ID NO: 19.

[00757] Вариант осуществления 178 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающиеся тем, что РНК, разработанная для направления на CIITA, содержит SEQ ID NO: 20.

[00758] Вариант осуществления 179 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающиеся тем, что РНК, разработанная для направления на CIITA, содержит SEQ ID NO: 21.

[00759] Вариант осуществления 180 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающиеся тем, что РНК, разработанная для направления на CIITA, содержит SEQ ID NO: 22.

[00760] Вариант осуществления 181 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающиеся тем, что РНК, разработанная для направления на CIITA, содержит SEQ ID NO: 23.

[00761] Вариант осуществления 182 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающиеся тем, что РНК, разработанная для направления на CIITA, содержит SEQ ID NO: 24.

[00762] Вариант осуществления 183 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающиеся тем, что РНК, разработанная для направления на CIITA, содержит SEQ ID NO: 25.

[00763] Вариант осуществления 184 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающиеся тем, что РНК, разработанная для направления на CIITA, содержит SEQ ID NO: 26.

[00764] Вариант осуществления 185 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающиеся тем, что РНК, разработанная для направления на CIITA, содержит SEQ ID NO: 27.

[00765] Вариант осуществления 186 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающиеся тем, что РНК, разработанная для направления на CIITA, содержит SEQ ID NO: 28.

[00766] Вариант осуществления 187 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающиеся тем, что РНК, разработанная для направления на CIITA, содержит SEQ ID NO: 29.

[00767] Вариант осуществления 188 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающиеся тем, что РНК, разработанная для направления на CIITA, содержит SEQ ID NO: 30.

[00768] Вариант осуществления 189 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающиеся тем, что РНК, разработанная для направления на CIITA, содержит SEQ ID NO: 31.

[00769] Вариант осуществления 190 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающиеся тем, что РНК, разработанная для направления на CIITA, содержит SEQ ID NO: 32.

[00770] Вариант осуществления 191 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающиеся тем, что РНК, разработанная для направления на CIITA, содержит SEQ ID NO: 33.

[00771] Вариант осуществления 192 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающиеся тем, что РНК, разработанная для направления на CIITA, содержит SEQ ID NO: 34.

[00772] Вариант осуществления 193 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающиеся тем, что РНК, разработанная для направления на CIITA, содержит SEQ ID NO: 35.

[00773] Вариант осуществления 194 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающиеся тем, что РНК, разработанная для направления на CIITA, содержит SEQ ID NO: 36.

[00774] Вариант осуществления 195 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающиеся тем, что РНК, разработанная для направления на CIITA, содержит SEQ ID NO: 37.

[00775] Вариант осуществления 196 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающиеся тем, что РНК, разработанная для направления на CIITA, содержит SEQ ID NO: 38.

[00776] Вариант осуществления 197 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающиеся тем, что РНК, разработанная для направления на CIITA, содержит SEQ ID NO: 39.

[00777] Вариант осуществления 198 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающиеся тем, что РНК, разработанная для направления на CIITA, содержит SEQ ID NO: 40.

[00778] Вариант осуществления 199 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающиеся тем, что РНК, разработанная для направления на CIITA, содержит SEQ ID NO: 41.

[00779] Вариант осуществления 200 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающиеся тем, что РНК, разработанная для направления на CIITA, содержит SEQ ID NO: 42.

[00780] Вариант осуществления 201 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающиеся тем, что РНК, разработанная для направления на CIITA, содержит SEQ ID NO: 43.

[00781] Вариант осуществления 202 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающиеся тем, что РНК, разработанная для направления на CIITA, содержит SEQ ID NO: 44.

[00782] Вариант осуществления 203 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающиеся тем, что РНК, разработанная для направления на CIITA, содержит SEQ ID NO: 45.

[00783] Вариант осуществления 204 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающиеся тем, что РНК, разработанная для направления на CIITA, содержит SEQ ID NO: 46.

[00784] Вариант осуществления 205 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающиеся тем, что РНК, разработанная для направления на CIITA, содержит SEQ ID NO: 47.

[00785] Вариант осуществления 206 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающиеся тем, что РНК, разработанная для направления на CIITA, содержит SEQ ID NO: 48.

[00786] Вариант осуществления 207 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающиеся тем, что РНК, разработанная для направления на CIITA, содержит SEQ ID NO: 49.

[00787] Вариант осуществления 208 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающиеся тем, что РНК, разработанная для направления на CIITA, содержит SEQ ID NO: 50.

[00788] Вариант осуществления 209 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающиеся тем, что РНК, разработанная для направления на CIITA, содержит SEQ ID NO: 51.

[00789] Вариант осуществления 210 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающиеся тем, что РНК, разработанная для направления на CIITA, содержит SEQ ID NO: 52.

[00790] Вариант осуществления 211 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающиеся тем, что РНК, разработанная для направления на CIITA, содержит SEQ ID NO: 53.

[00791] Вариант осуществления 212 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающиеся тем, что РНК, разработанная для направления на CIITA, содержит SEQ ID NO: 54.

[00792] Вариант осуществления 213 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающиеся тем, что РНК, разработанная для направления на CIITA, содержит SEQ ID NO: 55.

[00793] Вариант осуществления 214 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающиеся тем, что РНК, разработанная для направления на CIITA, содержит SEQ ID NO: 56.

[00794] Вариант осуществления 215 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающиеся тем, что РНК, разработанная для направления на CIITA, содержит SEQ ID NO: 57.

[00795] Вариант осуществления 216 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающиеся тем, что РНК, разработанная для направления на CIITA, содержит SEQ ID NO: 58.

[00796] Вариант осуществления 217 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающиеся тем, что РНК, разработанная для направления на CIITA, содержит SEQ ID NO: 59.

[00797] Вариант осуществления 218 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающиеся тем, что РНК, разработанная для направления на CIITA, содержит SEQ ID NO: 60.

[00798] Вариант осуществления 219 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающиеся тем, что РНК, разработанная для направления на CIITA, содержит SEQ ID NO: 61.

[00799] Вариант осуществления 220 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающиеся тем, что РНК, разработанная для направления на CIITA, содержит SEQ ID NO: 62.

[00800] Вариант осуществления 221 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающиеся тем, что РНК, разработанная для направления на CIITA, содержит SEQ ID NO: 63.

[00801] Вариант осуществления 222 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающиеся тем, что РНК, разработанная для направления на CIITA, содержит SEQ ID NO: 64.

[00802] Вариант осуществления 223 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающиеся тем, что РНК, разработанная для направления на CIITA, содержит SEQ ID NO: 65.

[00803] Вариант осуществления 224 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающиеся тем, что РНК, разработанная для направления на CIITA, содержит SEQ ID NO: 66.

[00804] Вариант осуществления 225 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающиеся тем, что РНК, разработанная для направления на CIITA, содержит SEQ ID NO: 67.

[00805] Вариант осуществления 226 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающиеся тем, что РНК, разработанная для направления на CIITA, содержит SEQ ID NO: 68.

[00806] Вариант осуществления 227 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающиеся тем, что РНК, разработанная для направления на CIITA, содержит SEQ ID NO: 69.

[00807] Вариант осуществления 228 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающиеся тем, что РНК, разработанная для направления на CIITA, содержит SEQ ID NO: 70.

[00808] Вариант осуществления 229 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающиеся тем, что РНК, разработанная для направления на CIITA, содержит SEQ ID NO: 71.

[00809] Вариант осуществления 230 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающиеся тем, что РНК, разработанная для направления на CIITA, содержит SEQ ID NO: 72.

[00810] Вариант осуществления 231 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающиеся тем, что РНК, разработанная для направления на CIITA, содержит SEQ ID NO: 73.

[00811] Вариант осуществления 232 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающиеся тем, что РНК, разработанная для направления на CIITA, содержит SEQ ID NO: 74.

[00812] Вариант осуществления 233 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающиеся тем, что РНК, разработанная для направления на CIITA, содержит SEQ ID NO: 75.

[00813] Вариант осуществления 234 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающиеся тем, что РНК, разработанная для направления на CIITA, содержит SEQ ID NO: 76.

[00814] Вариант осуществления 235 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающиеся тем, что РНК, разработанная для направления на CIITA, содержит SEQ ID NO: 77.

[00815] Вариант осуществления 236 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающиеся тем, что РНК, разработанная для направления на CIITA, содержит SEQ ID NO: 78.

[00816] Вариант осуществления 237 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающиеся тем, что РНК, разработанная для направления на CIITA, содержит SEQ ID NO: 79.

[00817] Вариант осуществления 238 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающиеся тем, что РНК, разработанная для направления на CIITA, содержит SEQ ID NO: 80.

[00818] Вариант осуществления 239 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающиеся тем, что РНК, разработанная для направления на CIITA, содержит SEQ ID NO: 81.

[00819] Вариант осуществления 240 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающиеся тем, что РНК, разработанная для направления на CIITA, содержит SEQ ID NO: 82.

[00820] Вариант осуществления 241 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающиеся тем, что РНК, разработанная для направления на CIITA, содержит SEQ ID NO: 83.

[00821] Вариант осуществления 242 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающиеся тем, что РНК, разработанная для направления на CIITA, содержит SEQ ID NO: 84.

[00822] Вариант осуществления 243 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающиеся тем, что РНК, разработанная для направления на CIITA, содержит SEQ ID NO: 85.

[00823] Вариант осуществления 244 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающиеся тем, что РНК, разработанная для направления на CIITA, содержит SEQ ID NO: 86.

[00824] Вариант осуществления 245 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающиеся тем, что РНК, разработанная для направления на CIITA, содержит SEQ ID NO: 87.

[00825] Вариант осуществления 246 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающиеся тем, что РНК, разработанная для направления на CIITA, содержит SEQ ID NO: 88.

[00826] Вариант осуществления 247 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающиеся тем, что РНК, разработанная для направления на CIITA, содержит SEQ ID NO: 89.

[00827] Вариант осуществления 248 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающиеся тем, что РНК, разработанная для направления на CIITA, содержит SEQ ID NO: 90.

[00828] Вариант осуществления 249 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающиеся тем, что РНК, разработанная для направления на CIITA, содержит SEQ ID NO: 91.

[00829] Вариант осуществления 250 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающиеся тем, что РНК, разработанная для направления на CIITA, содержит SEQ ID NO: 92.

[00830] Вариант осуществления 251 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающиеся тем, что РНК, разработанная для направления на CIITA, содержит SEQ ID NO: 93.

[00831] Вариант осуществления 252 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающиеся тем, что РНК, разработанная для направления на CIITA, содержит SEQ ID NO: 94.

[00832] Вариант осуществления 253 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающиеся тем, что РНК, разработанная для направления на CIITA, содержит SEQ ID NO: 95.

[00833] Вариант осуществления 254 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающиеся тем, что РНК, разработанная для направления на CIITA, содержит SEQ ID NO: 96.

[00834] Вариант осуществления 255 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающиеся тем, что РНК, разработанная для направления на CIITA, содержит SEQ ID NO: 97.

[00835] Вариант осуществления 256 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающиеся тем, что РНК, разработанная для направления на CIITA, содержит SEQ ID NO: 98.

[00836] Вариант осуществления 257 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающиеся тем, что РНК, разработанная для направления на CIITA, содержит SEQ ID NO: 99.

[00837] Вариант осуществления 258 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающиеся тем, что РНК, разработанная для направления на CIITA, содержит SEQ ID NO: 100.

[00838] Вариант осуществления 259 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающиеся тем, что РНК, разработанная для направления на CIITA, содержит SEQ ID NO: 101.

[00839] Вариант осуществления 260 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающиеся тем, что РНК, разработанная для направления на CIITA, содержит SEQ ID NO: 102.

[00840] Вариант осуществления 261 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающиеся тем, что РНК, разработанная для направления на CIITA, содержит SEQ ID NO: 103.

[00841] Вариант осуществления 262 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающиеся тем, что РНК, разработанная для направления на CIITA, содержит SEQ ID NO: 104.

[00842] Вариант осуществления 263 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающиеся тем, что РНК, разработанная для направления на CIITA, содержит SEQ ID NO: 105.

[00843] Вариант осуществления 264 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающиеся тем, что РНК, разработанная для направления на CIITA, содержит SEQ ID NO: 106.

[00844] Вариант осуществления 265 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающиеся тем, что РНК, разработанная для направления на CIITA, содержит SEQ ID NO: 107.

[00845] Вариант осуществления 266 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающиеся тем, что РНК, разработанная для направления на CIITA, содержит SEQ ID NO: 108.

[00846] Вариант осуществления 267 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающиеся тем, что РНК, разработанная для направления на CIITA, содержит SEQ ID NO: 109.

[00847] Вариант осуществления 268 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающиеся тем, что РНК, разработанная для направления на CIITA, содержит SEQ ID NO: 110.

[00848] Вариант осуществления 269 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающиеся тем, что РНК, разработанная для направления на CIITA, содержит SEQ ID NO: 111.

[00849] Вариант осуществления 270 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающиеся тем, что РНК, разработанная для направления на CIITA, содержит SEQ ID NO: 112.

[00850] Вариант осуществления 271 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающиеся тем, что РНК, разработанная для направления на CIITA, содержит SEQ ID NO: 113.

[00851] Вариант осуществления 272 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающиеся тем, что РНК, разработанная для направления на CIITA, содержит SEQ ID NO: 114.

[00852] Вариант осуществления 273 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающиеся тем, что РНК, разработанная для направления на CIITA, содержит SEQ ID NO: 115.

[00853] Вариант осуществления 274 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающиеся тем, что РНК, разработанная для направления на CIITA, содержит SEQ ID NO: 116.

[00854] Вариант осуществления 275 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающиеся тем, что РНК, разработанная для направления на CIITA, содержит SEQ ID NO: 117.

[00855] Вариант осуществления 276 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающиеся тем, что РНК, разработанная для направления на CIITA, содержит по меньшей мере одну модификацию.

[00856] Вариант осуществления 277 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающиеся тем, что РНК, разработанная для направления на CIITA, содержит по меньшей мере одну модификацию, при этом по меньшей мере одна модификация включает 2’-O-метил (2’-O-Me) модифицированный нуклеотид.

[00857] Вариант осуществления 278 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающиеся тем, что РНК, разработанная для направления на CIITA, содержит по меньшей мере одну модификацию, включающую фосфоротиоатную (PS) связь между нуклеотидами.

[00858] Вариант осуществления 279 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, где CIITA-направленная РНК содержит по меньшей мере одну модификацию, содержащую 2’-фтор (2’-F) модифицированный нуклеотид.

[00859] Вариант осуществления 280 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, где CIITA-направленная РНК содержит по меньшей мере одну модификацию, включающую модификацию одного или нескольких из первых пяти нуклеотидов на 5’-конце направляющей РНК.

[00860] Вариант осуществления 281 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, при этом CIITA-направленная РНК содержит по меньшей мере одну модификацию, включающую модификацию одного или нескольких из последних пяти нуклеотидов на 3'-конце направляющей РНК.

[00861] Вариант осуществления 282 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, где CIITA-направленная РНК содержит по меньшей мере одну модификацию, содержащую PS-связь между первыми четырьмя нуклеотидами направляющей РНК.

[00862] Вариант осуществления 283 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, где CIITA-направленная РНК содержит по меньшей мере одну модификацию, содержащую PS-связь между последними четырьмя нуклеотидами направляющей РНК.

[00863] Вариант осуществления 284 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, где CIITA-направленная РНК содержит по меньшей мере одну модификацию, включающую 2’-O-Me модифицированный нуклеотид в первых трех нуклеотидах на 5’-конце направляющей РНК.

[00864] Вариант осуществления 285 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, отличающиеся тем, что РНК, разработанная для направления на CIITA, содержит по меньшей мере одну модификацию, содержащую модифицированный нуклеотид 2'-O-Me на последних трех нуклеотидах на 3'-конце направляющей РНК.

[00865] Вариант осуществления 286 представляет собой сконструированную клетку или популяцию клеток, содержащую генетическую модификацию, которая включает индел в геномной области, на которую нацелена CIITA-направленная РНК по любому из предыдущих вариантов осуществления.

[00866] Вариант осуществления 287 представляет собой сконструированную клетку или популяцию клеток, содержащую генетическую модификацию, которая включает замену C на T или замену A на G в геномной области, на которую нацелена CIITA-направленная РНК по любому из предыдущих вариантов осуществления.

[00867] Вариант осуществления 288 представляет собой сконструированную

клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления для применения с целью экспрессии TCR со специфичностью к полипептиду, экспрессируемому раковыми клетками.

[00868] Вариант осуществления 289 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления для применения при введении субъекту в качестве терапии на основе адоптивного переноса клеток (АПК).

[00869] Вариант осуществления 290 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления для применения при лечении субъекта, больного раком.

[00870] Вариант осуществления 291 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления для применения при лечении субъекта с инфекционным заболеванием.

[00871] Вариант осуществления 292 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления для применения при лечении субъекта с аутоиммунным заболеванием..

[00872] Вариант осуществления 293 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ по любому из предыдущих вариантов осуществления, где генетическая модификация включает индел.

[00873] Вариант осуществления 294 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ по любому из предыдущих вариантов осуществления, где генетическая модификация включает замену C на T.

[00874] Вариант осуществления 295 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ по любому из предыдущих вариантов осуществления, где генетическая модификация включает замену от A до G.

[00875] Вариант осуществления 296 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ по любому из предыдущих вариантов осуществления, где клетка является гомозиготной по HLA-B и гомозиготной по HLA-C.

[00876] Вариант осуществления 297 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, где клетка дополнительно содержит генетическую модификацию гена HLA-A, причем клетка является гомозиготной по HLA-B и гомозиготной для HLA-C, и при этом генетическая модификация в гене HLA-A включает по меньшей мере один нуклеотид в пределах геномных координат, выбранных

из: (a) chr6:29942854-chr6:29942913 и (b) chr6:29943518-chr6: 29943619.

[00877] Вариант осуществления 298 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, где клетка дополнительно содержит генетическую модификацию в гене HLA-A, и где генетическая модификация в гене HLA-A содержит по меньшей мере один нуклеотид в пределах геномных координат, выбранных из: от chr6:29942864 до chr6: 29942903.

[00878] Вариант осуществления 299 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, при этом клетка дополнительно содержит генетическую модификацию в гене HLA-A, и при этом генетическая модификация в гене HLA-A включает по меньшей мере один нуклеотид в пределах геномных координат, выбранных из: от chr6:29943528 до chr6:29943609.

[00879] Вариант осуществления 300 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, где клетка дополнительно содержит генетическую модификацию в гене HLA-A, и где генетическая модификация в гене HLA-A содержит по меньшей мере один нуклеотид в пределах геномных координат, выбранных из: chr6:29942864-29942884; chr6:29942868-29942888; chr6:29942876-29942896; chr6:29942877-29942897; chr6:29942883-29942903; chr6:29943126-29943146; chr6:29943528-29943548; chr6:29943529-29943549; chr6:29943530-29943550; chr6:29943537-29943557; chr6:29943549-29943569; chr6:29943589-29943609 и chr6:29944026-29944046.

[00880] Вариант осуществления 301 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, где клетка дополнительно содержит генетическую модификацию в гене HLA-A, и где генетическая модификация в гене HLA-A содержит индел, замену C на T или замену A на G в пределах геномных координат, выбранных из: chr6:29942864-29942884; chr6:29942868-29942888; chr6:29942876-29942896; chr6:29942877-29942897; chr6:29942883-29942903; chr6:29943126-29943146; chr6:29943528-29943548; chr6:29943529-29943549; chr6:29943530-29943550; chr6:29943537-29943557; chr6:29943549-29943569; chr6:29943589-29943609 и chr6:29944026-29944046.

[00881] Вариант осуществления 302 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, где экспрессия HLA-A в клетке снижена или устранена с помощью системы редактирования генов, которая связывается с геномной целевой последовательностью HLA-A, содержащей по меньшей мере 5 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат, выбранных из: chr6:29942864-29942884; chr6:29942868-29942888; chr6:29942876-29942896; chr6:29942877-29942897;

chr6:29942883-29942903; chr6:29943126-29943146; chr6:29943528-29943548; chr6:29943529-29943549; chr6:29943530-29943550; chr6:29943537-29943557; chr6:29943549-29943569; chr6:29943589-29943609 и chr6:29944026-29944046.

[00882] Вариант осуществления 303 представляет собой способ получения сконструированной клетки, в которой снижена или устранена поверхностная экспрессия белка MHC класса II и белка HLA-A по сравнению с немодифицированной клеткой, включающий: (a) приведение клетки в контакт с CIITA-направленной РНК, при этом направляющая РНК содержит направляющую последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1-117;(b) приведение клетки в контакт с HLA-A-направленной РНК, при этом HLA-A-направленная РНК содержит направляющую последовательность, выбранную из любой из SEQ ID NO: 2001-2095 годы; и (c) необязательно приведение клетки в контакт с ДНК-связывающим агентом, направляемым РНК, или нуклеиновой кислотой, кодирующей ДНК-связывающий агент, направляемый РНК; тем самым снижая или устраняя поверхностную экспрессию белка MHC класса II и белка HLA-A в клетке по сравнению с немодифицированной клеткой.

[00883] Вариант осуществления 304 представляет собой способ согласно варианту осуществления 303, в котором CIITA-направленная РНК содержит последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 32, 64, 67, 68, 74, 76, 84, 86, 90, 91 и 115.

[00884] Вариант осуществления 305 представляет собой способ по варианту осуществления 303 или 304, включающий приведение клетки в контакт с РНК-направляемым ДНК-связывающим агентом или нуклеиновой кислотой, кодирующей РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, необязательно, где РНК-направляемый ДНК-связывающий агент содержит Cas9 S. pyogenes.

[00885] Вариант осуществления 306 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, где HLA-B выбран из любых из следующих аллелей HLA-B: HLA-B*07:02; HLA-B*08:01; HLA-B*44:02; HLA-B*35:01; HLA-B*40:01; HLA-B*57:01; HLA-B*14:02; HLA-B*15:01; HLA-B*13:02; HLA-B*44:03; HLA-B*38:01; HLA-B*18:01; HLA-B*44:03; HLA-B*51:01; HLA-B*49:01; HLA-B*15:01; HLA-B*18:01; HLA-B*27:05; HLA-B*35:03; HLA-B*18:01; HLA-B*52:01; HLA-B*51:01; HLA-B*37:01; HLA-B*53:01; HLA-B*55:01; HLA-B*44:02; HLA-B*44:03; HLA-B*35:02; HLA-B*15:01 и HLA-B*40:02.

[00886] Вариант осуществления 307 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, где HLA-C выбран из любого из следующих аллелей HLA-C: HLA-C*07:02; HLA-C*07:01; HLA-C*05:01; HLA-C*04:01 HLA-C*03:04; HLA-C*06:02; HLA-C*08:02; HLA-C*03:03; HLA-C*06:02; HLA-C*16:01; HLA-C*12:03; HLA-C*07:01; HLA-C*04:01; HLA-C*15:02; HLA-C*07:01; HLA-C*03:04; HLA-C*12:03; HLA-C*02:02; HLA-C*04:01; HLA-C*05:01; HLA-C*12:02; HLA-C*14:02; HLA-C*06:02; HLA-C*04:01; HLA-C*03:03; HLA-C*07:04; HLA-C*07:01; HLA-C*04:01;

HLA-C*04:01 и HLA-C*02:02.

[00887] Вариант осуществления 308 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, где аллель HLA-B выбран из любого из следующих аллелей HLA-B: HLA-B*07:02; HLA-B*08:01; HLA-B*44:02; HLA-B*35:01; HLA-B*40:01; HLA-B*57:01; HLA-B*14:02; HLA-B*15:01; HLA-B*13:02; HLA-B*44:03; HLA-B*38:01; HLA-B*18:01; HLA-B*44:03; HLA-B*51:01; HLA-B*49:01; HLA-B*15:01; HLA-B*18:01; HLA-B*27:05; HLA-B*35:03; HLA-B*18:01; HLA-B*52:01; HLA-B*51:01; HLA-B*37:01; HLA-B*53:01; HLA-B*55:01; HLA-B*44:02; HLA-B*44:03; HLA-B*35:02; HLA-B*15:01 и HLA-B*40:02; и аллель HLA-C выбран из любого из следующих аллелей HLA-C: HLA-C*07:02; HLA-C*07:01; HLA-C*05:01; HLA-C*04:01 HLA-C*03:04; HLA-C*06:02; HLA-C*08:02; HLA-C*03:03; HLA-C*06:02; HLA-C*16:01; HLA-C*12:03; HLA-C*07:01; HLA-C*04:01; HLA-C*15:02; HLA-C*07:01; HLA-C*03:04; HLA-C*12:03; HLA-C*02:02; HLA-C*04:01; HLA-C*05:01; HLA-C*12:02; HLA-C*14:02; HLA-C*06:02; HLA-C*04:01; HLA-C*03:03; HLA-C*07:04; HLA-C*07:01; HLA-C*04:01; HLA-C*04:01 и HLA-C*02:02.

[00888] Вариант осуществления 309 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, где аллели HLA-B и HLA-C выбраны из любого из следующих аллелей HLA-B и HLA-C: HLA-B*07:02 и HLA-C*07:02; HLA-B*08:01 и HLA-C*07:01; HLA-B*44:02 и HLA-C*05:01; HLA-B*35:01 и HLA-C*04:01; HLA-B*40:01 и HLA-C*03:04; HLA-B*57:01 и HLA-C*06:02; HLA-B*14:02 и HLA-C*08:02; HLA-B*15:01 и HLA-C*03:03; HLA-B*13:02 и HLA-C*06:02; HLA-B*44:03 и HLA-C*16:01; HLA-B*38:01 и HLA-C*12:03; HLA-B*18:01 и HLA-C*07:01; HLA-B*44:03 и HLA-C*04:01; HLA-B*51:01 и HLA-C*15:02; HLA-B*49:01 и HLA-C*07:01; HLA-B*15:01 и HLA-C*03:04; HLA-B*18:01 и HLA-C*12:03; HLA-B*27:05 и HLA-C*02:02; HLA-B*35:03 и HLA-C*04:01; HLA-B*18:01 и HLA-C*05:01; HLA-B*52:01 и HLA-C*12:02; HLA-B*51:01 и HLA-C*14:02; HLA-B*37:01 и HLA-C*06:02; HLA-B*53:01 и HLA-C*04:01; HLA-B*55:01 и HLA-C*03:03; HLA-B*44:02 и HLA-C*07:04; HLA-B*44:03 и HLA-C*07:01; HLA-B*35:02 и HLA-C*04:01; HLA-B*15:01 и HLA-C*04:01; и HLA-B*40:02 и HLA-C*02:02.

[00889] Вариант осуществления 310 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, где аллели HLA-B и HLA-C представляют собой HLA-B*07:02 и HLA-C*07:02.

[00890] Вариант осуществления 311 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, где аллели HLA-B и HLA-C представляют собой HLA-B*08:01 и HLA-C*07:01.

[00891] Вариант осуществления 312 представляет собой сконструированную

клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, где аллели HLA-B и HLA-C представляют собой HLA-B*44:02 и HLA-C*05:01.

[00892] Вариант осуществления 313 представляет собой сконструированную клетку, популяцию клеток, фармацевтическую композицию или способ в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, где аллели HLA-B и HLA-C представляют собой HLA-B*35:01 и HLA-C*04:01.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Сконструированная клетка, в которой снижена или устранена поверхностная экспрессия MHC класса II по сравнению с немодифицированной клеткой, содержащая генетическую модификацию в гене CIITA, при этом генетическая модификация включает по меньшей мере один нуклеотид экзона в пределах геномных координат chr16:10902662-chr16:10923285.

2. Сконструированная клетка по п. 1, отличающаяся тем, что генетическая модификация включает по меньшей мере 5, 6, 7, 8, 9 или 10 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат chr16:10902662-chr16:10923285.

3. Сконструированная клетка по п. 1 или п. 2, отличающаяся тем, что генетическая модификация включает по меньшей мере одну замену C на T или по меньшей мере одну замену A на G в пределах геномных координат chr16:10902662-chr16:10923285.

4. Сконструированная клетка по любому из пп. 1-3, отличающаяся тем, что генетическая модификация включает по меньшей мере один нуклеотид экзона в пределах геномных координат chr16:10906542-chr16:10923285.

5. Сконструированная клетка по любому из пп. 1-4, отличающаяся тем, что генетическая модификация включает по меньшей мере один нуклеотид экзона в пределах геномных координат chr16:10906542-chr16:10908121.

6. Сконструированная клетка по любому из пп. 1-5, отличающаяся тем, что генетическая модификация включат по меньшей мере один нуклеотид экзона в пределах геномных координат, выбранных из: chr16:10907539-10907559, chr16:10916426-10916446, chr16:10906907-10906927, chr16:10895702-10895722, chr16:10907757-10907777, chr16:10907623-10907643, chr16:10915626-10915646, chr16:10906756-10906776, chr16:10907476-10907496, chr16:10907385-10907405 и chr16:10923265-10923285.

7. Сконструированная клетка по любому из пп. 1-6, отличающаяся тем, что генетическая модификация включает по меньшей мере один нуклеотид экзона в пределах геномных координат, выбранных из: chr16:10916432-10916452, chr16:10922444-10922464, chr16:10907924-10907944, chr16:10906985-10907005, chr16:10908073-10908093, chr16:10907433-10907453, chr16:10907979-10907999, chr16:10907139-10907159, chr16:10922435-10922455, chr16:10907384-10907404, chr16:10907434-10907454, chr16:10907119-10907139, chr16:10907539-10907559, chr16:10907810-10907830, chr16:10907315-10907335, chr16:10916426-10916446, chr16:10909138-10909158, chr16:10908101-10908121, chr16:10907790-10907810, chr16:10907787-10907807, chr16:10907454-10907474, chr16:10895702-10895722, chr16:10902729-10902749, chr16:10918492-10918512, chr16:10907932-10907952, chr16:10907623-10907643, chr16:10907461-10907481, chr16:10902723-10902743, chr16:10907622-10907642, chr16:10922441-10922461, chr16:10902662-10902682, chr16:10915626-10915646, chr16:10915592-10915612, chr16:10907385-10907405, chr16:10907030-10907050, chr16:10907935-10907955, chr16:10906853-10906873, chr16:10906757-10906777, chr16:10907730-10907750 и chr16:10895302-10895322.

8. Сконструированная клетка, в которой снижена или устранена поверхностная экспрессия MHC класса II по сравнению с немодифицированной клеткой, содержащая генетическую модификацию в гене CIITA, при этом генетическая модификация включает индел, замену C на T или замену A на G в пределах геномных координат, выбранных из: chr16:10902662-10902682, chr16:10902723-10902743, chr16:10902729-10902749, chr16:10903747-10903767, chr16:10903824-10903844, chr16:10903824-10903844, chr16:10903848-10903868, chr16:10904761-10904781, chr16:10904764-10904784, chr16:10904765-10904785, chr16:10904785-10904805, chr16:10906542-10906562, chr16:10906556-10906576, chr16:10906609-10906629, chr16:10906610-10906630, chr16:10906616-10906636, chr16:10906682-10906702, chr16:10906756-10906776, chr16:10906757-10906777, chr16:10906757-10906777, chr16:10906821-10906841, chr16:10906823-10906843, chr16:10906847-10906867, chr16:10906848-10906868, chr16:10906853-10906873, chr16:10906904-10906924, chr16:10906907-10906927, chr16:10906913-10906933, chr16:10906968-10906988, chr16:10906970-10906990, chr16:10906985-10907005, chr16:10907030-10907050, chr16:10907058-10907078, chr16:10907119-10907139, chr16:10907139-10907159, chr16:10907172-10907192, chr16:10907272-10907292, chr16:10907288-10907308, chr16:10907314-10907334, chr16:10907315-10907335, chr16:10907325-10907345, chr16:10907363-10907383, chr16:10907384-10907404, chr16:10907385-10907405, chr16:10907433-10907453, chr16:10907434-10907454, chr16:10907435-10907455, chr16:10907441-10907461, chr16:10907454-10907474, chr16:10907461-10907481, chr16:10907476-10907496, chr16:10907539-10907559, chr16:10907586-10907606, chr16:10907589-10907609, chr16:10907621-10907641, chr16:10907622-10907642, chr16:10907623-10907643, chr16:10907730-10907750, chr16:10907731-10907751, chr16:10907757-10907777, chr16:10907781-10907801, chr16:10907787-10907807, chr16:10907790-10907810, chr16:10907810-10907830, chr16:10907820-10907840, chr16:10907870-10907890, chr16:10907886-10907906, chr16:10907924-10907944, chr16:10907928-10907948, chr16:10907932-10907952, chr16:10907935-10907955, chr16:10907978-10907998, chr16:10907979-10907999, chr16:10908069-10908089, chr16:10908073-10908093, chr16:10908101-10908121, chr16:10909056-10909076, chr16:10909138-10909158, chr16:10910195-10910215, chr16:10910196-10910216, chr16:10915592-10915612, chr16:10915626-10915646, chr16:10916375-10916395, chr16:10916382-10916402, chr16:10916426-10916446, chr16:10916432-10916452, chr16:10918486-10918506, chr16:10918492-10918512, chr16:10918493-10918513, chr16:10922435-10922455, chr16:10922441-10922461, chr16:10922441-10922461, chr16:10922444-10922464, chr16:10922460-10922480, chr16:10923257-10923277 и chr16:10923265-10923285.

9. Сконструированная клетка по п. 8, отличающаяся тем, что генетическая модификация включает по меньшей мере один нуклеотид экзона в пределах геномных координат, выбранных из: chr16:10916432-10916452, chr16:10922444-10922464, chr16:10907924-10907944, chr16:10906985-10907005, chr16:10908073-10908093,

chr16:10907433-10907453, chr16:10907979-10907999, chr16:10907139-10907159, chr16:10922435-10922455, chr16:10907384-10907404, chr16:10907434-10907454, chr16:10907119-10907139, chr16:10907539-10907559, chr16:10907810-10907830, chr16:10907315-10907335, chr16:10916426-10916446, chr16:10909138-10909158, chr16:10908101-10908121, chr16:10907790-10907810, chr16:10907787-10907807, chr16:10907454-10907474, chr16:10895702-10895722, chr16:10902729-10902749, chr16:10918492-10918512, chr16:10907932-10907952, chr16:10907623-10907643, chr16:10907461-10907481, chr16:10902723-10902743, chr16:10907622-10907642, chr16:10922441-10922461, chr16:10902662-10902682, chr16:10915626-10915646, chr16:10915592-10915612, chr16:10907385-10907405, chr16:10907030-10907050, chr16:10907935-10907955, chr16:10906853-10906873, chr16:10906757-10906777, chr16:10907730-10907750, chr16:10907586-10907606, chr16:10907476-10907496, chr16:10906904-10906924 и chr16:10895302-10895322.

10. Сконструированная клетка по п. 8 или п. 9, отличающаяся тем, что генетическая модификация включает по меньшей мере один нуклеотид экзона в пределах геномных координат, выбранных из: chr16:10907539-10907559, chr16:10916426-10916446, chr16:10906907-10906927, chr16:10895702-10895722, chr16:10907757-10907777, chr16:10907623-10907643, chr16:10915626-10915646, chr16:10906756-10906776, chr16:10907476-10907496, chr16:10907385-10907405 и chr16:10923265-10923285.

11. Сконструированная клетка по любому из пп. 8-10, отличающаяся тем, что генетическая модификация включает по меньшей мере 5, 6, 7, 8, 9 или 10 последовательных нуклеотидов в пределах геномных координат.

12. Сконструированная клетка по любому из пп. 8-11, отличающаяся тем, что генетическая модификация включает по меньшей мере одну замену C на T или по меньшей мере одну замену A на G в пределах геномных координат.

13. Сконструированная клетка по любому из пп. 1-12, отличающаяся тем, что экспрессия MHC класса II снижена или устранена с помощью системы редактирования генов, которая связывается с целевой геномной последовательностью CIITA, содержащей по меньшей мере 5 последовательных нуклеотидов в геномных координатах, выбранных из: chr16:10902662-10902682, chr16:10902723-10902743, chr16:10902729-10902749, chr16:10903747-10903767, chr16:10903824-10903844, chr16:10903824-10903844, chr16:10903848-10903868, chr16:10904761-10904781, chr16:10904764-10904784, chr16:10904765-10904785, chr16:10904785-10904805, chr16:10906542-10906562, chr16:10906556-10906576, chr16:10906609-10906629, chr16:10906610-10906630, chr16:10906616-10906636, chr16:10906682-10906702, chr16:10906756-10906776, chr16:10906757-10906777, chr16:10906757-10906777, chr16:10906821-10906841, chr16:10906823-10906843, chr16:10906847-10906867, chr16:10906848-10906868, chr16:10906853-10906873, chr16:10906853-10906873, chr16:10906904-10906924, chr16:10906907-10906927, chr16:10906913-10906933, chr16:10906968-10906988, chr16:10906970-10906990, chr16:10906985-10907005, chr16:10907030-10907050,

chr16:10907058-10907078, chr16:10907119-10907139, chr16:10907139-10907159, chr16:10907172-10907192, chr16:10907272-10907292, chr16:10907288-10907308, chr16:10907314-10907334, chr16:10907315-10907335, chr16:10907325-10907345, chr16:10907363-10907383, chr16:10907384-10907404, chr16:10907385-10907405, chr16:10907433-10907453, chr16:10907434-10907454, chr16:10907435-10907455, chr16:10907441-10907461, chr16:10907454-10907474, chr16:10907461-10907481, chr16:10907476-10907496, chr16:10907539-10907559, chr16:10907586-10907606, chr16:10907589-10907609, chr16:10907621-10907641, chr16:10907622-10907642, chr16:10907623-10907643, chr16:10907730-10907750, chr16:10907731-10907751, chr16:10907757-10907777, chr16:10907781-10907801, chr16:10907787-10907807, chr16:10907790-10907810, chr16:10907810-10907830, chr16:10907820-10907840, chr16:10907870-10907890, chr16:10907886-10907906, chr16:10907924-10907944, chr16:10907928-10907948, chr16:10907932-10907952, chr16:10907935-10907955, chr16:10907978-10907998, chr16:10907979-10907999, chr16:10908069-10908089, chr16:10908073-10908093, chr16:10908101-10908121, chr16:10909056-10909076, chr16:10909138-10909158, chr16:10910195-10910215, chr16:10910196-10910216, chr16:10915592-10915612, chr16:10915626-10915646, chr16:10916375-10916395, chr16:10916382-10916402, chr16:10916426-10916446, chr16:10916432-10916452, chr16:10918486-10918506, chr16:10918492-10918512, chr16:10918493-10918513, chr16:10922435-10922455, chr16:10922441-10922461, chr16:10922441-10922461, chr16:10922444-10922464, chr16:10922460-10922480, chr16:10923257-10923277 и chr16:10923265-10923285.

14. Сконструированная клетка по любому из пп. 1-13, отличающаяся тем, что экспрессия MHC класса II снижена или устранена с помощью системы редактирования генов, которая связывается с целевой геномной последовательностью CIITA, содержащей по меньшей мере 5 последовательных нуклеотидов в пределах геномных координат, выбранных из: chr16:10906542-10906562, chr16:10906556-10906576, chr16:10906609-10906629, chr16:10906610-10906630, chr16:10906616-10906636, chr16:10906682-10906702, chr16:10906756-10906776, chr16:10906757-10906777, chr16:10906757-10906777, chr16:10906821-10906841, chr16:10906823-10906843, chr16:10906847-10906867, chr16:10906848-10906868, chr16:10906853-10906873, chr16:10906853-10906873, chr16:10906904-10906924, chr16:10906907-10906927, chr16:10906913-10906933, chr16:10906968-10906988, chr16:10906970-10906990, chr16:10906985-10907005, chr16:10907030-10907050, chr16:10907058-10907078, chr16:10907119-10907139, chr16:10907139-10907159, chr16:10907172-10907192, chr16:10907272-10907292, chr16:10907288-10907308, chr16:10907314-10907334, chr16:10907315-10907335, chr16:10907325-10907345, chr16:10907363-10907383, chr16:10907384-10907404, chr16:10907385-10907405, chr16:10907433-10907453, chr16:10907434-10907454, chr16:10907435-10907455, chr16:10907441-10907461, chr16:10907454-10907474, chr16:10907461-10907481, chr16:10907476-10907496, chr16:10907539-10907559,

chr16:10907586-10907606, chr16:10907589-10907609, chr16:10907621-10907641, chr16:10907622-10907642, chr16:10907623-10907643, chr16:10907730-10907750, chr16:10907731-10907751, chr16:10907757-10907777, chr16:10907781-10907801, chr16:10907787-10907807, chr16:10907790-10907810, chr16:10907810-10907830, chr16:10907820-10907840, chr16:10907870-10907890, chr16:10907886-10907906, chr16:10907924-10907944, chr16:10907928-10907948, chr16:10907932-10907952, chr16:10907935-10907955, chr16:10907978-10907998, chr16:10907979-10907999, chr16:10908069-10908089, chr16:10908073-10908093, chr16:10908101-10908121, chr16:10909056-10909076, chr16:10909138-10909158, chr16:10910195-10910215, chr16:10910196-10910216, chr16:10915592-10915612, chr16:10915626-10915646, chr16:10916375-10916395, chr16:10916382-10916402, chr16:10916426-10916446, chr16:10916432-10916452, chr16:10918486-10918506, chr16:10918492-10918512, chr16:10918493-10918513, chr16:10922435-10922455, chr16:10922441-10922461, chr16:10922441-10922461, chr16:10922444-10922464, chr16:10922460-10922480, chr16:10923257-10923277 и chr16:10923265-10923285.

15. Сконструированная клетка по любому из пп. 1-14, отличающаяся тем, что экспрессия MHC класса II снижена или устранена с помощью системы редактирования генов, которая связывается с целевой геномной последовательностью CIITA, содержащей по меньшей мере 5 последовательных нуклеотидов в пределах геномных координат, выбранных из: chr16:10906542-10906562, chr16:10906556-10906576, chr16:10906609-10906629, chr16:10906610-10906630, chr16:10906616-10906636, chr16:10906682-10906702, chr16:10906756-10906776, chr16:10906757-10906777, chr16:10906757-10906777, chr16:10906821-10906841, chr16:10906823-10906843, chr16:10906847-10906867, chr16:10906848-10906868, chr16:10906853-10906873, chr16:10906853-10906873, chr16:10906904-10906924, chr16:10906907-10906927, chr16:10906913-10906933, chr16:10906968-10906988, chr16:10906970-10906990, chr16:10906985-10907005, chr16:10907030-10907050, chr16:10907058-10907078, chr16:10907119-10907139, chr16:10907139-10907159, chr16:10907172-10907192, chr16:10907272-10907292, chr16:10907288-10907308, chr16:10907314-10907334, chr16:10907315-10907335, chr16:10907325-10907345, chr16:10907363-10907383, chr16:10907384-10907404, chr16:10907385-10907405, chr16:10907433-10907453, chr16:10907434-10907454, chr16:10907435-10907455, chr16:10907441-10907461, chr16:10907454-10907474, chr16:10907461-10907481, chr16:10907476-10907496, chr16:10907539-10907559, chr16:10907586-10907606, chr16:10907589-10907609, chr16:10907621-10907641, chr16:10907622-10907642, chr16:10907623-10907643, chr16:10907730-10907750, chr16:10907731-10907751, chr16:10907757-10907777, chr16:10907781-10907801, chr16:10907787-10907807, chr16:10907790-10907810, chr16:10907810-10907830, chr16:10907820-10907840, chr16:10907870-10907890, chr16:10907886-10907906, chr16:10907924-10907944, chr16:10907928-10907948, chr16:10907932-10907952,

chr16:10907935-10907955, chr16:10907978-10907998, chr16:10907979-10907999, chr16:10908069-10908089, chr16:10908073-10908093 и chr16:10908101-10908121.

16. Сконструированная клетка по любому из пп. 1-15, отличающаяся тем, что экспрессия MHC класса II снижена или устранена с помощью системы редактирования генов, которая связывается с целевой геномной последовательностью CIITA, содержащей по меньшей мере 5 последовательных нуклеотидов в пределах геномных координат, выбранных из: chr16:10916432-10916452, chr16:10922444-10922464, chr16:10907924-10907944, chr16:10906985-10907005, chr16:10908073-10908093, chr16:10907433-10907453, chr16:10907979-10907999, chr16:10907139-10907159, chr16:10922435-10922455, chr16:10907384-10907404, chr16:10907434-10907454, chr16:10907119-10907139, chr16:10907539-10907559, chr16:10907810-10907830, chr16:10907315-10907335, chr16:10916426-10916446, chr16:10909138-10909158, chr16:10908101-10908121, chr16:10907790-10907810, chr16:10907787-10907807, chr16:10907454-10907474, chr16:10895702-10895722, chr16:10902729-10902749, chr16:10918492-10918512, chr16:10907932-10907952, chr16:10907623-10907643, chr16:10907461-10907481, chr16:10902723-10902743, chr16:10907622-10907642, chr16:10922441-10922461, chr16:10902662-10902682, chr16:10915626-10915646, chr16:10915592-10915612, chr16:10907385-10907405, chr16:10907030-10907050, chr16:10907935-10907955, chr16:10906853-10906873, chr16:10906757-10906777, chr16:10907730-10907750 и chr16:10895302-10895322.

17. Сконструированная клетка по любому из пп. 1-16, отличающаяся тем, что экспрессия MHC класса II снижена или устранена с помощью системы редактирования генов, которая связывается с целевой геномной последовательностью CIITA, содержащей по меньшей мере 5 последовательных нуклеотидов в пределах геномных координат, выбранных из: chr16:10907539-10907559, chr16:10916426-10916446, chr16:10906907-10906927, chr16:10895702-10895722, chr16:10907757-10907777, chr16:10907623-10907643, chr16:10915626-10915646, chr16:10906756-10906776, chr16:10907476-10907496, chr16:10907385-10907405 и chr16:10923265-10923285.

18. Сконструированная клетка по любому из пп. 13-17, отличающаяся тем, что целевая геномная последовательность CIITA содержит по меньшей мере 10 или по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов в пределах геномных координат.

19. Сконструированная клетка по любому из пп. 13-18, отличающаяся тем, что система редактирования генов содержит РНК-направленный ДНК-связывающий агент, необязательно при этом РНК-направленный ДНК-связывающий агент содержит белок Cas9, такой как Cas9 S. pyogenes.

20. Сконструированная клетка по любому из пп. 1-19, причем сконструированная клетка дополнительно имеет сниженную или устраненную поверхностную экспрессию MHC класса I.

21. Сконструированная клетка по п. 20, причем сконструированная клетка содержит генетическую модификацию в гене бета-2-микроглобулина (B2M).

22. Сконструированная клетка по п. 20, причем сконструированная клетка содержит генетическую модификацию в гене HLA-A.

23. Сконструированная клетка по любому из пп. 1-22, причем сконструированная клетка содержит экзогенную нуклеиновую кислоту, кодирующую нацеливающий рецептор, который экспрессируется на поверхности сконструированной клетки.

24. Сконструированная клетка по п. 23, отличающаяся тем, что нацеливающий рецептор представляет собой CAR, Т-клеточный рецептор (TCR) или TCR WT1.

25. Сконструированная клетка по любому из пп. 1-24, причем сконструированная клетка дополнительно содержит экзогенную нуклеиновую кислоту, кодирующую полипептид, который секретируется сконструированной клеткой.

26. Сконструированная клетка по любому из пп. 1-25, причем сконструированная клетка представляет собой Т-клетку и дополнительно имеет сниженную или устраненную экспрессию белка эндогенного Т-клеточного рецептора (TCR) по сравнению с немодифицированной клеткой.

27. Сконструированная клетка по п. 26, отличающаяся тем, что в клетке снижена или устранена экспрессия белка TRAC или белка TRBC по сравнению с немодифицированной клеткой.

28. Фармацевтическая композиция, содержащая сконструированную клетку по любому из пп. 1-27.

29. Популяция клеток, содержащая сконструированную клетку по любому из пп. 1-27.

30. Фармацевтическая композиция, содержащая популяцию клеток, причем популяция клеток содержит сконструированную клетку по любому из пп. 1-27.

31. Популяция клеток по п. 29 или фармацевтическая композиция по п. 30, отличающаяся тем, что популяция клеток является на по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% отрицательной по MHC класса II, при измерении с помощью проточной цитометрии.

32. Популяция клеток или фармацевтическая композиция по любому из пп. 29-31, причем популяция клеток является на по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% отрицательной по эндогенному белку TCR при измерении с помощью проточной цитометрии.

33. Способ введения сконструированной клетки, популяции клеток или фармацевтической композиции по любому из пп. 1-32 субъекту, нуждающемуся в этом.

34. Способ введения сконструированной клетки, популяции клеток или фармацевтической композиции по любому из пп. 1-33 субъекту в качестве терапии на основе адоптивного переноса клеток (АПК).

35. Способ создания сконструированной клетки, в которой снижена или устранена поверхностная экспрессия белка MHC класса II по сравнению с немодифицированной клеткой, включающий приведение клетки в контакт с композицией, содержащей:

CIITA-направленную РНК, содержащую

направляющую последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1-117;

по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 1-117;

направляющую последовательность на по меньшей мере 95%, 90% или 85% идентичную последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 1-117;

последовательность, которая содержит 10 смежных нуклеотидов ±10 нуклеотидов геномных координат, указанных в Таблице 2;

по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов последовательности из (iv); или

направляющую последовательность которая по на по меньшей мере 95%, 90% или 85% идентична последовательности, выбранной из (v); и

необязательно, РНК-направленный ДНК-связывающий агент или нуклеиновая кислота, кодирующая РНК-направляемый ДНК-связывающий агент.

36. Способ снижения или устранения поверхностной экспрессии белка MHC класса II в сконструированной клетке по сравнению с немодифицированной клеткой, включающий приведение клетки в контакт с композицией

содержащей:

CIITA-направленную РНК, содержащую

направляющую последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1-117;

по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 1-117;

направляющую последовательность на по меньшей мере 95%, 90% или 85% идентичную последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 1-117;

последовательность, которая содержит 10 смежных нуклеотидов ±10 нуклеотидов геномных координат, указанных в Таблице 2;

по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов последовательности из (iv); или

направляющую последовательность которая по на по меньшей мере 95%, 90% или 85% идентична последовательности, выбранной из (v); и

необязательно, РНК-направленный ДНК-связывающий агент или нуклеиновая кислота, кодирующая РНК-направляемый ДНК-связывающий агент.

37. Способ по п. 35 или п. 36, отличающийся тем, что CIITA-направленная РНК содержит

i) направляющую последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 32, 64, 67, 68, 74, 76, 84, 86, 90, 91 и 115;

ii) по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 последовательных нуклеотидов

последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 32, 64, 67, 68, 74, 76, 84, 86, 90, 91 и 115; или

iii) направляющую последовательность на по меньшей мере 95%, 90% или 85% идентичную последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 32, 64, 67, 68, 74, 76, 84, 86, 90, 91 и 115.

38. Способ по любому из пп. 35-37, дополнительно включающий снижение или устранение поверхностной экспрессии белка MHC класса I в клетке по сравнению с немодифицированной клеткой.

39. Способ по любому из пп. 35-38, дополнительно включающий снижение или устранение поверхностной экспрессии белка B2M в клетке по сравнению с немодифицированной клеткой.

40. Способ по любому из пп. 35-39, дополнительно включающий снижение или устранение поверхностной экспрессии белка HLA-A в клетке по сравнению с немодифицированной клеткой.

41. Способ по любому из пп. 35-40, дополнительно включающий снижение или устранение поверхностной экспрессии белка TCR в клетке по сравнению с немодифицированной клеткой.

42. Способ по любому из пп. 35-41, дополнительно включающий приведение клетки в контакт с экзогенной нуклеиновой кислотой.

43. Способ по любому из пп. 35-42, дополнительно включающий приведение клетки в контакт с ингибитором ДНК-зависимой протеинкиназы (DNAPKi).

44. Способ по п. 43, отличающийся тем, что DNAPKi представляет собой Соединение 1.

45. Способ по п. 42, дополнительно включающий приведение клетки в контакт с экзогенной нуклеиновой кислотой, кодирующей нацеливающий рецептор или полипептид, который секретируется клеткой.

46. Сконструированная клетка, популяция клеток, фармацевтическая композиция или способ по любому из пп. 1-45, включающие экзогенную нуклеиновую кислоту или приведение клетки в контакт с экзогенной нуклеиновой кислотой, причем экзогенная нуклеиновая кислота кодирует молекулу ингибитора NK-клеток.

47. Сконструированная клетка, популяция клеток, фармацевтическая композиция или способ по любому из пп. 1-46, включающие экзогенную нуклеиновую кислоту или приведение клетки в контакт с экзогенной нуклеиновой кислотой, при этом экзогенная нуклеиновая кислота кодирует молекулу ингибитора NK-клеток, при этом молекула ингибитора NK-клетки связывается с ингибирующим рецептором на NK-клетке, молекула ингибитора NK-клетки связывается с NKG2A на NK-клетке, молекула ингибитора NK-клетки представляет собой неклассическую молекулу MHC класса I, молекула ингибитора NK-клетки представляет собой HLA-E, молекула ингибитора NK-клеток представляет собой слитый белок, или молекула ингибитора NK-клетки представляет собой слитый белок, содержащий HLA-E и B2M.

48. Сконструированная клетка, популяция клеток, фармацевтическая композиция или способ по любому из пп. 1-47, включающие экзогенную нуклеиновую кислоту, кодирующую полипептид, который секретируется клеткой, или приведение клетки в контакт с указанной экзогенной нуклеиновой кислотой, при этом секретируемый полипептид представляет собой антитело или фрагмент антитела.

49. Сконструированная клетка, популяция клеток, фармацевтическая композиция или способ по любому из пп. 1-48, включающие экзогенную нуклеиновую кислоту, кодирующую полипептид, который секретируется клеткой, или приведение клетки в контакт с указанной экзогенной нуклеиновой кислотой, при этом секретируемый полипептид представляет собой полноразмерное антитело IgG, одноцепочечное антитело, нейтрализующее антитело.

50. Сконструированная клетка, популяция клеток, фармацевтическая композиция или способ по любому из пп. 1-49, включающие экзогенную нуклеиновую кислоту, кодирующую полипептид, который секретируется клеткой, или приведение клетки в контакт с указанной экзогенной нуклеиновой кислотой, при этом секретируемый полипептид представляет собой фермент, цитокин или слитый белок.

51. Сконструированная клетка, популяция клеток, фармацевтическая композиция или способ по любому из пп. 1-50, включающие экзогенную нуклеиновую кислоту, кодирующую полипептид, который секретируется клеткой, или приведение клетки в контакт с указанной экзогенной нуклеиновой кислотой, при этом секретируемый полипептид содержит растворимый рецептор.

52. Сконструированная клетка, популяция клеток, фармацевтическая композиция или способ по любому из пп. 1-51, включающие экзогенную нуклеиновую кислоту, кодирующую нацеливающий рецептор, или приведение клетки в контакт с экзогенной нуклеиновой кислотой, кодирующей нацеливающий рецептор, при этом нацеливающий рецептор представляет собой Т-клеточный рецептор (TCR), генетически модифицированный TCR, TCR WT1 или CAR.

53. Сконструированная клетка, популяция клеток, фармацевтическая композиция или способ по любому из пп. 23-52, отличающиеся тем, что CIITA-направленную РНК, РНК-направленный ДНК-связывающий агент и/или экзогенную нуклеиновую кислоту вводят в клетку в виде вектора, необязательно при этом CIITA-направленная РНК и РНК-направленный ДНК-связывающий агент представлены в одном и том же векторе.

54. Сконструированная клетка, популяция клеток, фармацевтическая композиция или способ по любому из пп. 1-53, отличающиеся тем, что экзогенную нуклеиновую кислоту вводят в клетку в векторе, необязательно, при этом вектор представляет собой вирусный вектор или невирусный вектор.

55. Сконструированная клетка, популяция клеток, фармацевтическая композиция или способ по п. 54, отличающиеся тем, что вектор представляет собой лентивирусный вектор или AAV.

56. Сконструированная клетка, популяция клеток, фармацевтическая композиция или способ по любому из пп. 1-55, отличающиеся тем, что компонент системы редактирования гена вводят в клетку в сборной композиции липид-нуклеиновая кислота.

57. Сконструированная клетка, популяция клеток, фармацевтическая композиция или способ по любому из пп. 1-56, отличающиеся тем, что направляющая РНК или экзогенная нуклеиновая кислота вводятся в клетку в сборной композиции липид-нуклеиновая кислота, необязательно в той же сборной композиции липид-нуклеиновая кислота, что и РНК-направленный ДНК-связывающий агент.

58. Сконструированная клетка, популяция клеток, фармацевтическая композиция или способ по п. 56 или п. 57, отличающиеся тем, что сборная композиция липид-нуклеиновая кислота представляет собой липидную наночастицу (LNP).

59. Сконструированная клетка, популяция клеток, фармацевтическая композиция или способ по любому из пп. 35-58, отличающиеся тем, что (i) CIITA-направленная РНК представляет собой одну направляющую РНК, содержащую любую из последовательностей SEQ ID NO: 335-426 и 1008, или последовательность, которая на по меньшей мере 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91% или 90% идентична любой из последовательностей SEQ ID NO: 335-426 и 1008;

(ii) CIITA-направленная РНК содержит любую из последовательностей SEQ ID NO: 32, 64, 67, 68, 74, 76, 84, 86, 90, 91 и 115;

(iii) CIITA-направленная РНК представляет собой одну направляющую РНК, содержащую любую из последовательностей SEQ ID NO: 341, 373, 376, 377, 383, 385, 393, 395, 399, 400 и 424, или последовательность, которая на по меньшей мере 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91% или 90% идентична любой из последовательностей SEQ ID NO: 341, 373, 376, 377, 383, 385, 393, 395, 399, 400 и 424.

60. Сконструированная клетка, популяция клеток, фармацевтическая композиция или способ по любому из пп. 35-59, отличающиеся тем, что CIITA-направленная РНК содержит по меньшей мере одну модификацию, при этом указанная по меньшей мере одна модификация включает (i) 2'-O-метил (2'-O-Me)-модифицированный нуклеотид, (ii) фосфоротиоатную (PS) связь между нуклеотидами, (iii) 2'-фтор (2'-F)-модифицированный нуклеотид, (iv) модификацию одного или нескольких из первых пяти нуклеотидов на 5'-конце направляющей РНК, (v) модификацию одного или нескольких из последних пяти нуклеотидов на 3'-конце направляющей РНК, (vi) PS-связь между первыми четырьмя нуклеотидами направляющей РНК, (vii) PS-связь между последними четырьмя нуклеотидами направляющей РНК, (viii) 2'-O-Me-модифицированный нуклеотид в первых трех нуклеотидах на 5'-конце направляющей РНК, (ix) 2'-O-Me-модифицированный нуклеотид в последних трех нуклеотидах на 3'-конце направляющей РНК, или комбинации одного или нескольких из (i)-(ix).

61. Сконструированная клетка или популяция клеток, содержащие генетическую модификацию, включающую индел в геномной области, на которую нацелена CIITA-направленная РНК по любому из пп. 35-60.

62. Сконструированная клетка или популяция клеток, содержащие генетическую модификацию, которая включает замену C на T или замену A на G в геномной области, на которую нацелена CIITA-направленная РНК по любому из пп. 35-61.

63. Сконструированная клетка, популяция клеток, фармацевтическая композиция или способ по любому из пп. 1-62 для применения для экспрессии TCR со специфичностью к полипептиду, экспрессируемому раковыми клетками.

64. Сконструированная клетка, популяция клеток, фармацевтическая композиция или способ по любому из пп. 1-63 для применения при введении субъекту в качестве терапии на основе адоптивного переноса клеток (АПК).

65. Сконструированная клетка, популяция клеток, фармацевтическая композиция или способ по любому из пп. 1-64 для применения при лечении субъекта, больного раком, инфекционным заболеванием или аутоиммунным заболеванием.

66. Сконструированная клетка, популяция клеток, фармацевтическая композиция или способ по любому из пп. 1-65, отличающиеся тем, что генетическая модификация включает индел.

67. Сконструированная клетка, популяция клеток, фармацевтическая композиция или способ по любому из пп. 1-66, отличающиеся тем, что генетическая модификация включает замену C на T.

68. Сконструированная клетка, популяция клеток, фармацевтическая композиция или способ по любому из пп. 1-67, отличающиеся тем, что генетическая модификация включает замену A на G.

69. Сконструированная клетка, популяция клеток, фармацевтическая композиция или способ по любому из пп. 1-68, отличающиеся тем, что клетка является гомозиготной по HLA-B и гомозиготной по HLA-C.

70. Сконструированная клетка, популяция клеток, фармацевтическая композиция или способ по любому из пп. 1-69, отличающиеся тем, что клетка дополнительно содержит генетическую модификацию в гене HLA-A, при этом клетка является гомозиготной по HLA-B и гомозиготной по HLA-C, и при этом генетическая модификация в гене HLA-A включает по меньшей мере один нуклеотид в пределах геномных координат, выбранных из:

от chr6:29942854 до chr6:29942913 и

от chr6:29943518 до chr6: 29943619.

71. Сконструированная клетка, популяция клеток, фармацевтическая композиция или способ по любому из пп. 1-70, отличающиеся тем, что клетка дополнительно содержит генетическую модификацию в гене HLA-A, и при этом генетическая модификация в гене HLA-A включает по меньшей мере один нуклеотид в пределах геномных координат, выбранных из: от chr6:29942864 до chr6: 29942903 и от chr6:29943528 до chr6:29943609.

72. Способ получения сконструированной клетки, в которой снижена или устранена поверхностная экспрессия белка MHC класса II и белка HLA-A по сравнению с немодифицированной клеткой, включающий:

приведение клетки в контакт с CIITA-направленной РНК, при этом направляющая РНК содержит направляющую последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1-117;

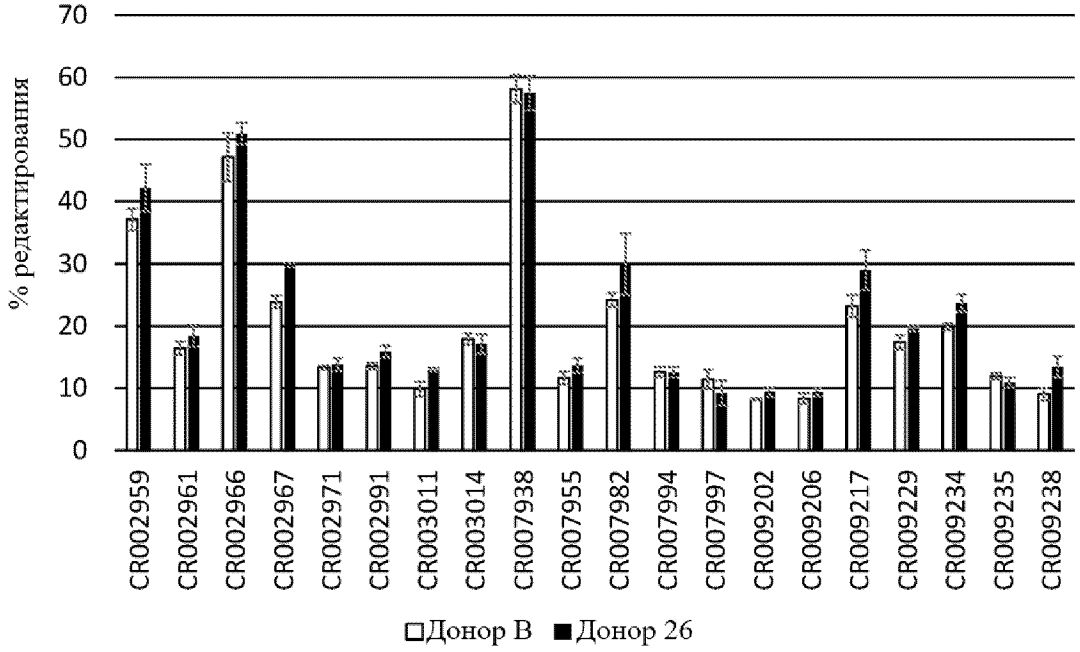
приведение клетки в контакт с HLA-A-направленной РНК, при этом HLA-A-направленная РНК содержит направляющую последовательность, выбранную из любой из SEQ ID NO: 2001-2095; и

необязательно приведение клетки в контакт с РНК-направленным ДНК-связывающим агентом или нуклеиновой кислотой, кодирующей РНК-направленный ДНК-связывающий агент;

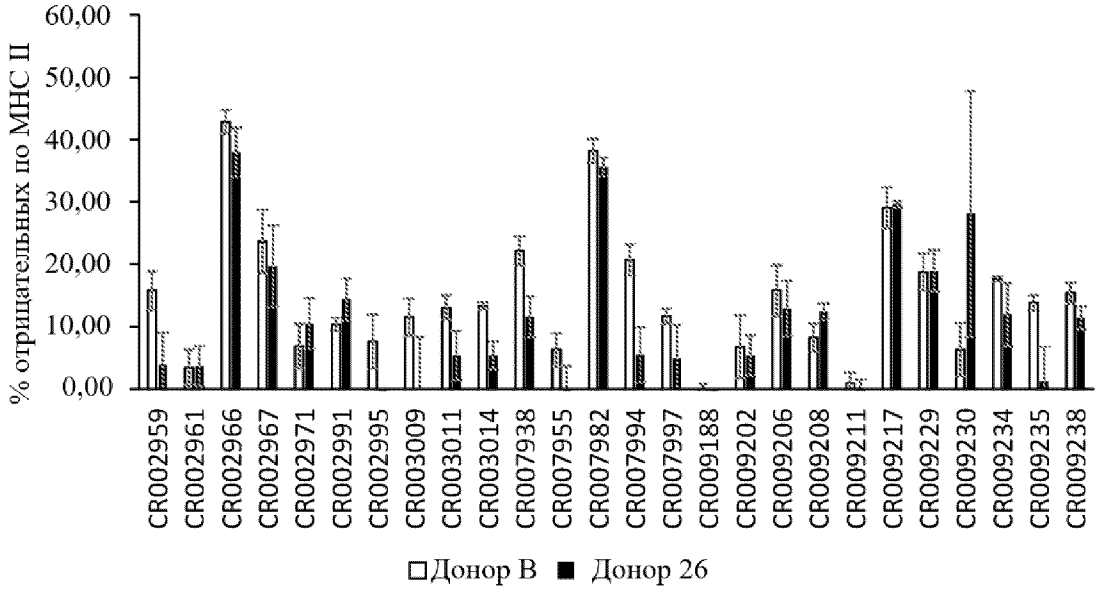
тем самым снижая или устраняя поверхностную экспрессию белка MHC класса II и белка HLA-A в клетке по сравнению с немодифицированной клеткой.

73. Способ по п. 72, отличающийся тем, что CIITA-направленная РНК содержит последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 32, 64, 67, 68, 74, 76, 84, 86, 90, 91 и 115.

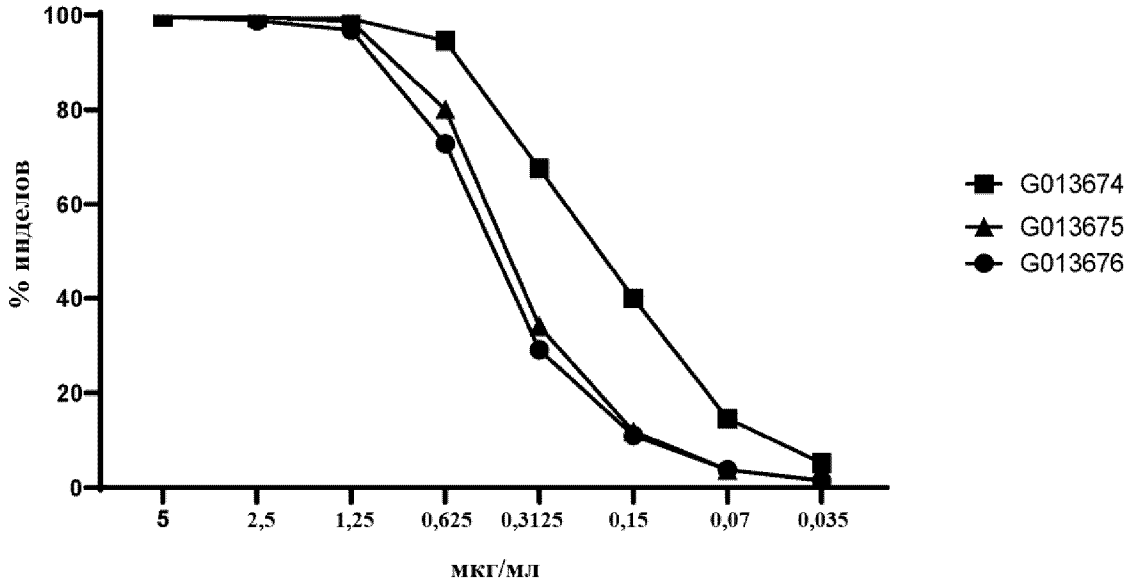
По доверенности


% редактирования
70
60
50
40
30
20
10
0
CR002959
CR002961
CR002966
CR002967
CR002971
CR002991
CR003011
CR003014
CR007938
CR007955
CR007982
CR007994
CR007997
CR009202
CR009206
CR009217
CR009229
CR009234
CR009235
CR009238
Донор B
Донор 26

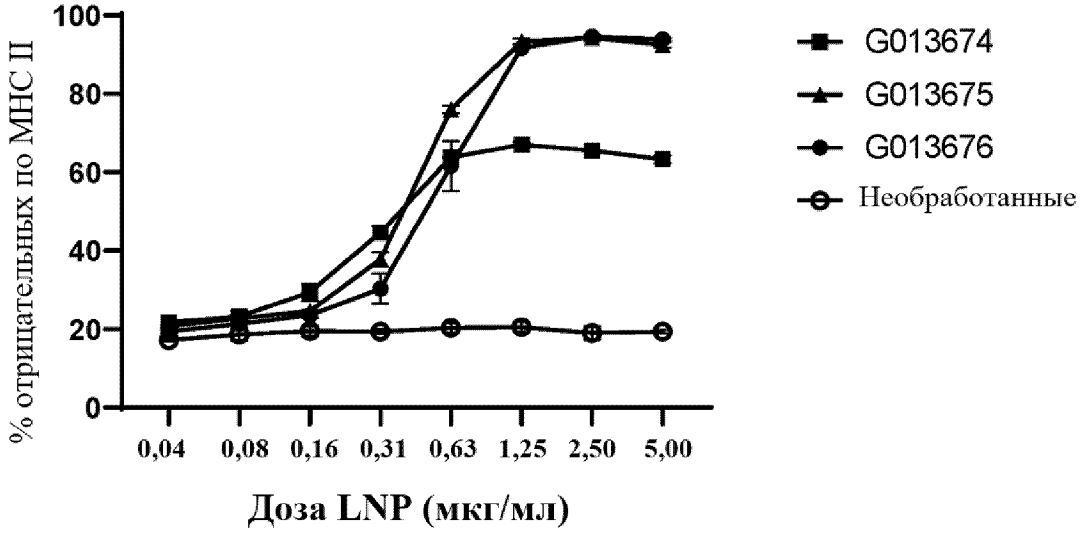
ФИГ. 1A


% отрицательных по MHC II
60,00
50,00
40,00
30,00
20,00
10,00
0,00
CR002959
CR002961
CR002966
CR002967
CR002971
CR002991
CR002995
CR003009
CR003011
CR003014
CR007938
CR007955
CR007982
CR007994
CR007997
CR009188
CR009202
CR009206
CR009208
CR009211
CR009217
CR009229
CR009230
CR009234
CR009235
CR009238
Донор B
Донор 26

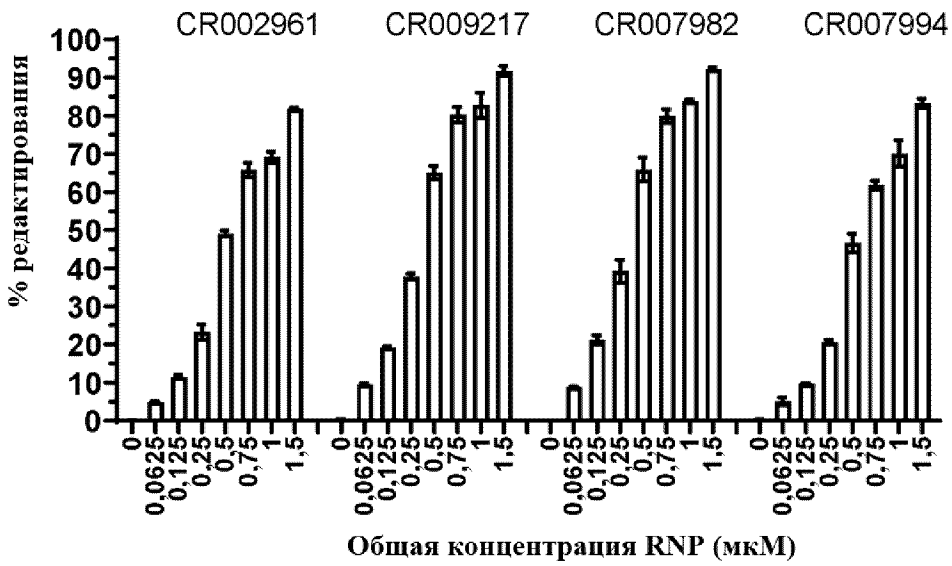
ФИГ. 1B


100
80
60
40
20
0
% инделов
5
2,5
1,25
0,625
0,3125
0,15
0,07
0,035
мкг/мл
G013674
G013675
G013676

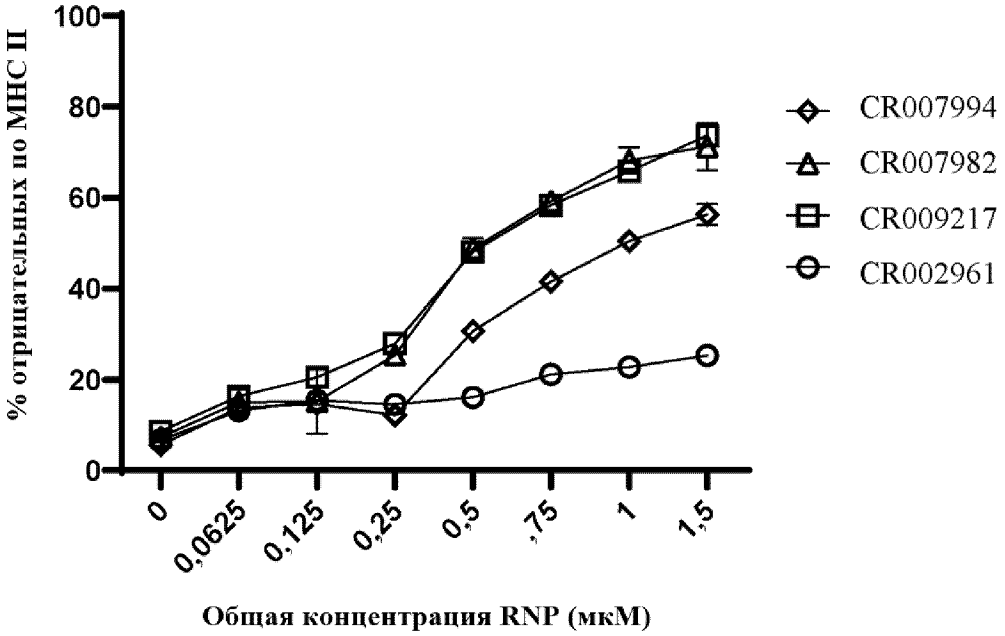
ФИГ. 2A


100
80
60
40
20
0
% отрицательных по МНС II
0,04
0,08
0,16
0,31
0,63
1,25
2,50
5,00
Доза LNP (мкг/мл)
G013674
G013675
G013676
Необработанные

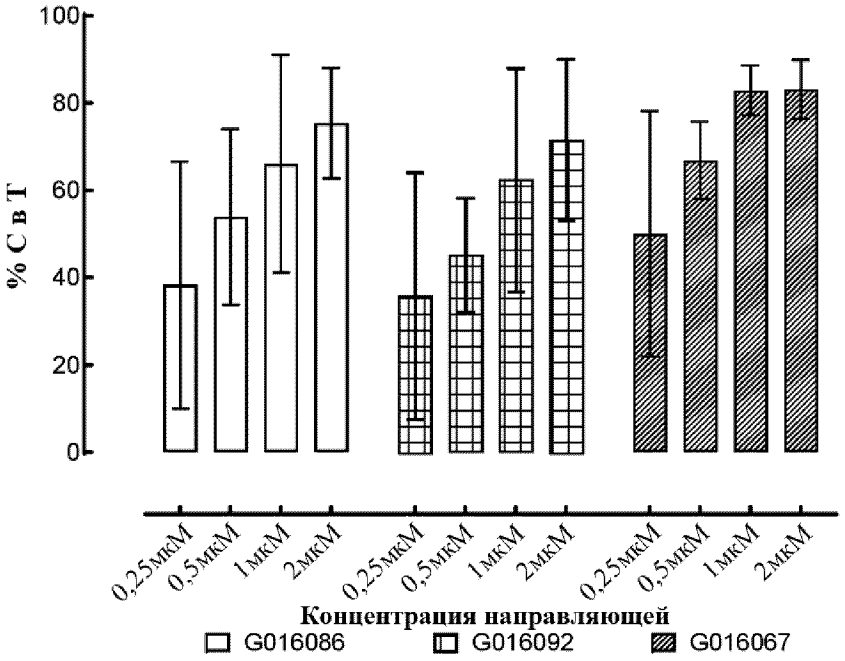
ФИГ. 2B


CR002961
CR009217
CR007982
CR007994
% редактирования
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0
0,0625
0,125
0,25
0,5
0,75
1
1,5
Общая концентрация RNP (мкМ)

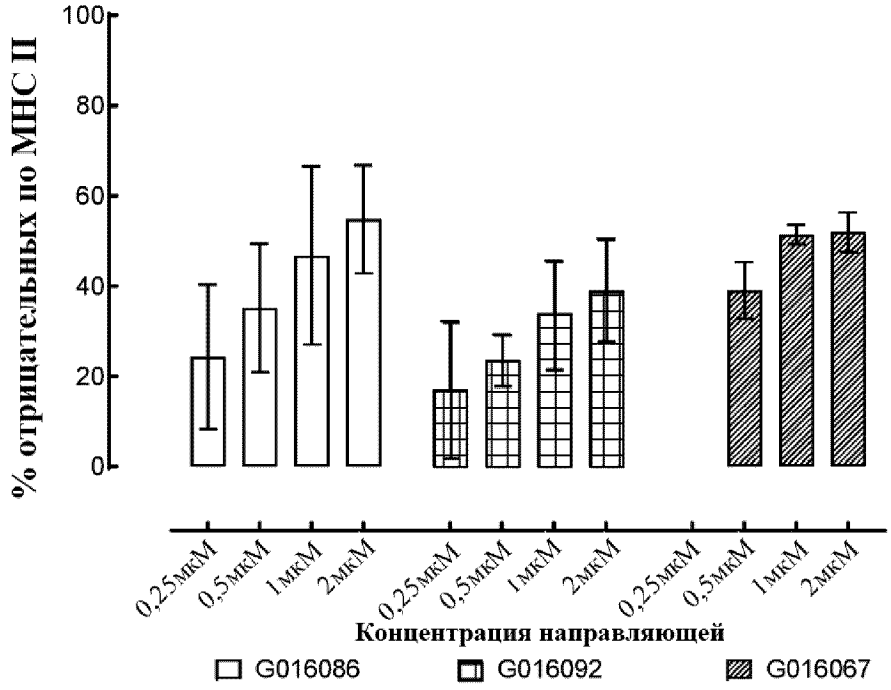
ФИГ. 3А


% отрицательных по МНС II
100
80
60
40
20
0
0
0,0625
0,125
0,25
0,5
,75
1
1,5
Общая концентрация RNP (мкМ)
CR007994
CR007982
CR009217
CR002961

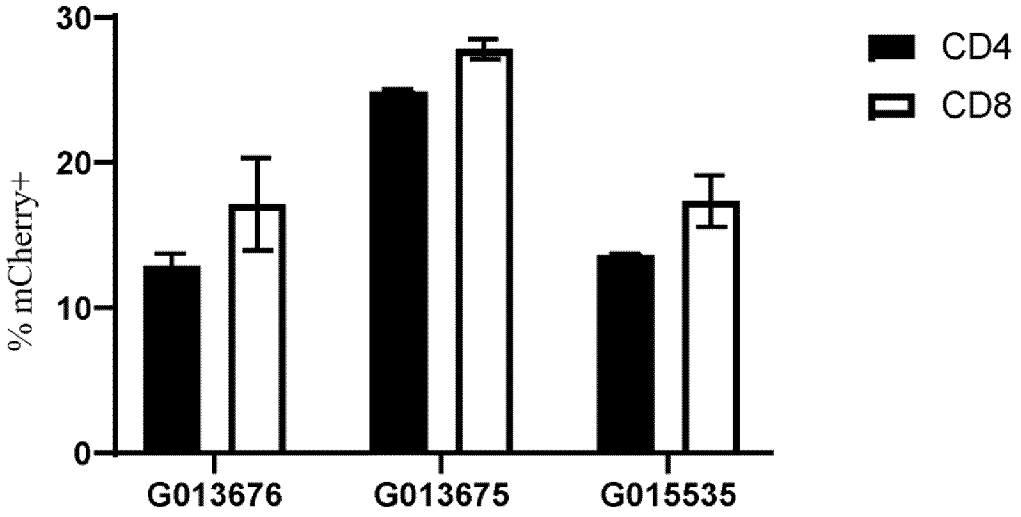
ФИГ. 3В


100
80
60
40
20
0
% С в Т
0,25мкМ
0,5мкМ
1мкМ
2мкМ
0,25мкМ
0,5мкМ
1мкМ
2мкМ
0,25мкМ
0,5мкМ
1мкМ
2мкМ
Концентрация направляющей
G016086
G016092
G016067

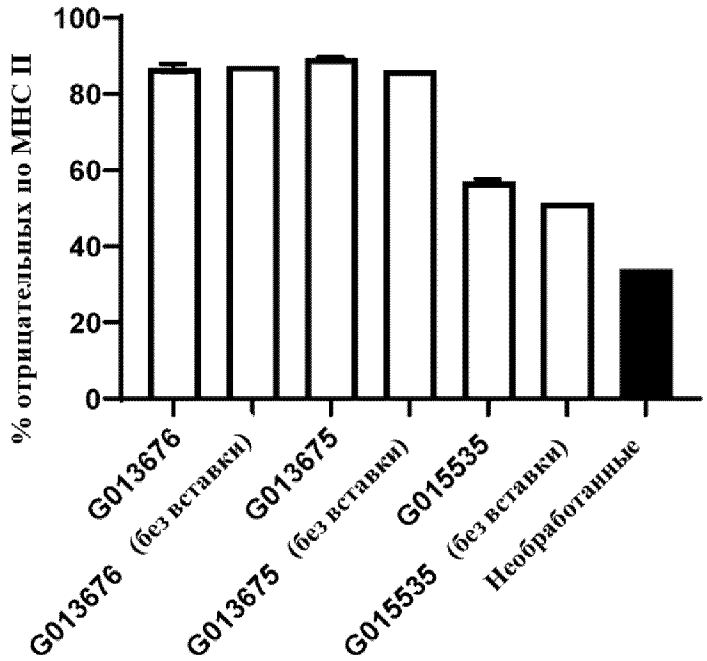
ФИГ. 4А


100
80
60
40
20
0
% отрицательных по МНС II
0,25мкМ
0,5мкМ
1мкМ
2мкМ
0,25мкМ
0,5мкМ
1мкМ
2мкМ
0,25мкМ
0,5мкМ
1мкМ
2мкМ
Концентрация направляющей
G016086
G016092
G016067

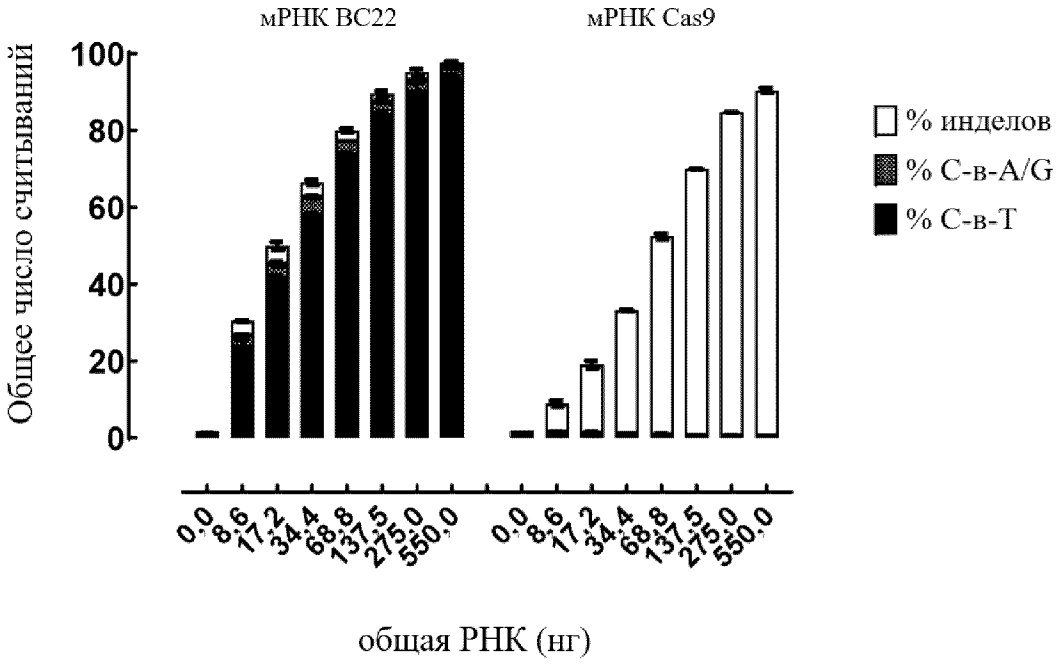
ФИГ. 4В


30
20
10
0
% mCherry+
CD4
CD8
G013676
G013675
G015535

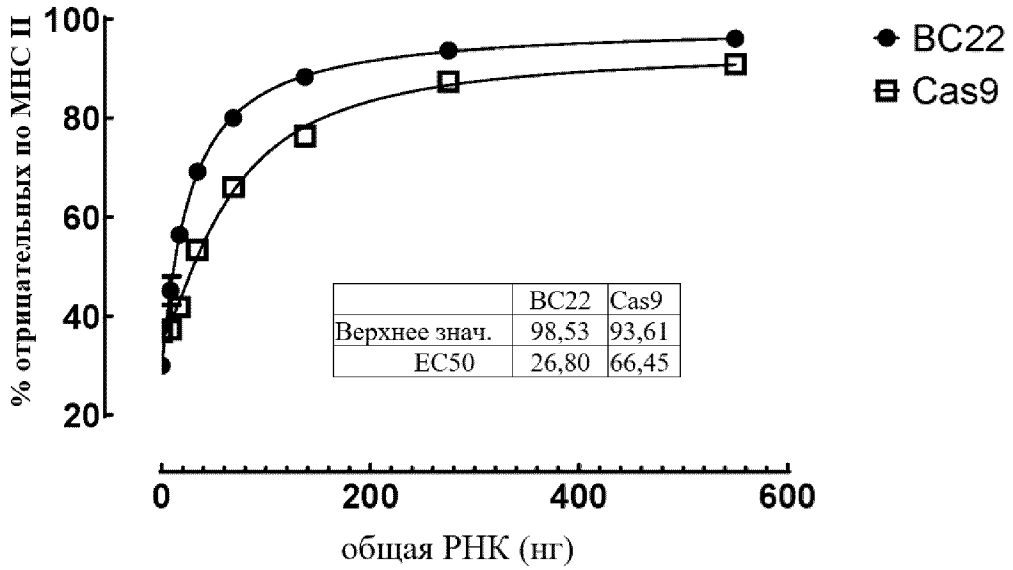
ФИГ. 5A


100
80
60
40
20
0
% отрицательных по МНС II
G013676
G013676 (без вставки)
G013675
G013675 (без вставки)
G015535
G015535 (без вставки)
Необработанные

ФИГ. 5B

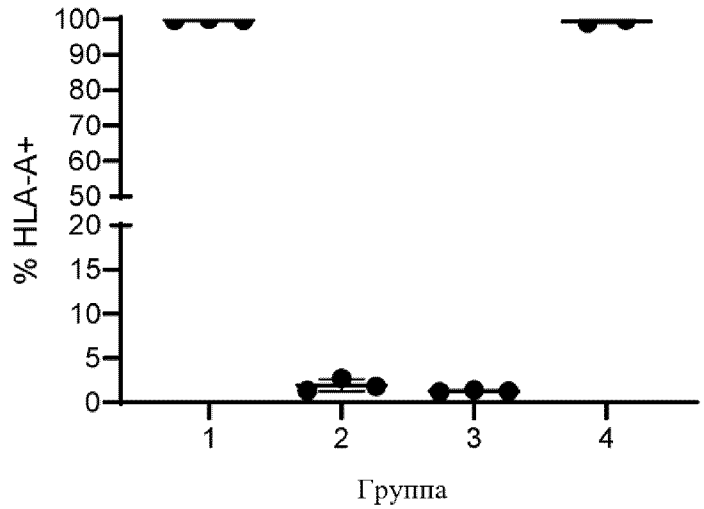


ФИГ. 6A

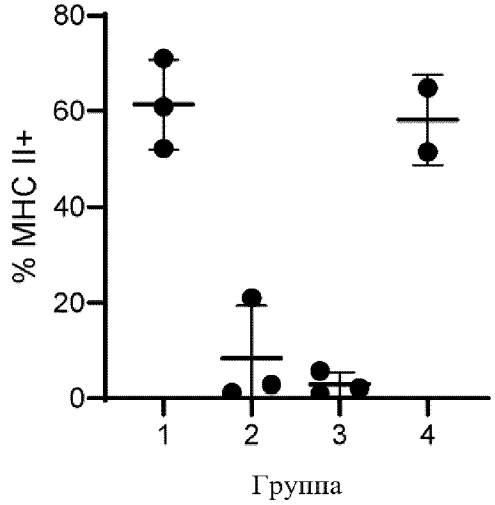


	BC22	Cas9
Верхнее знач.	98,53	93,61
EC50	26,80	66,45

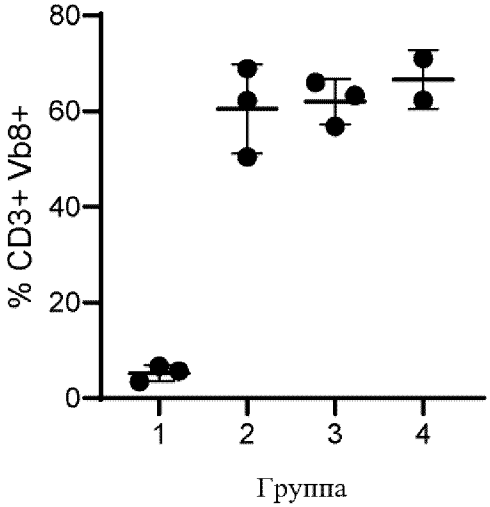
ФИГ. 6B


100
90
80
70
60
50
20
15
10
5
0
% HLA-A+
1
2
3
4
Группа

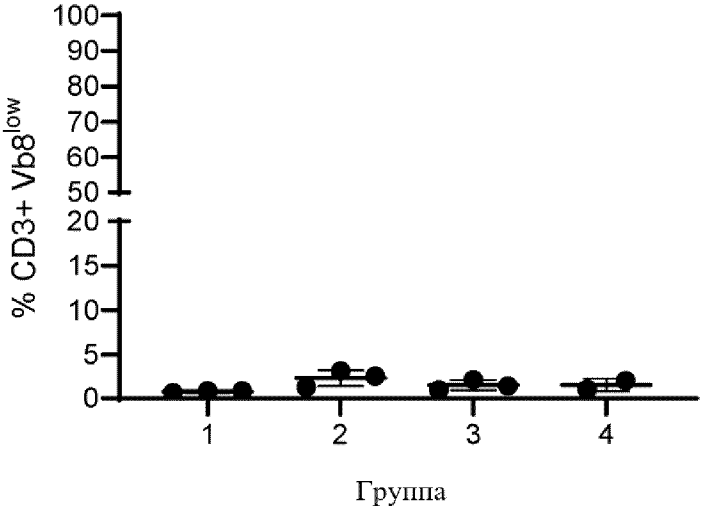
ФИГ. 7A


80
60
40
20
0
% MHC II+
1
2
3
4
Группа

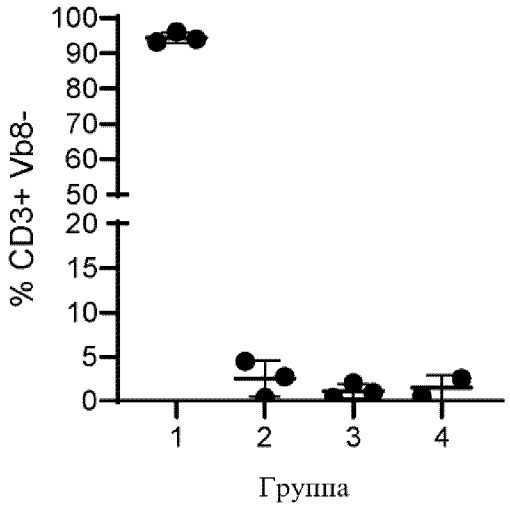
ФИГ. 7B


80
60
40
20
0
% CD3+ Vb8+
1
2
3
4
Группа

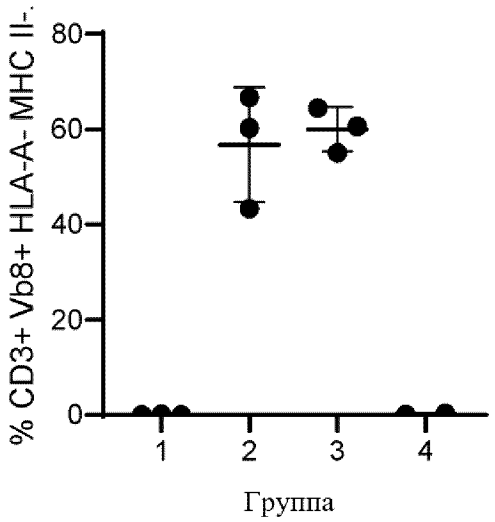
ФИГ. 7C


100
90
80
70
60
50
20
15
10
5
0
% CD3+ Vb8low
1
2
3
4
Группа

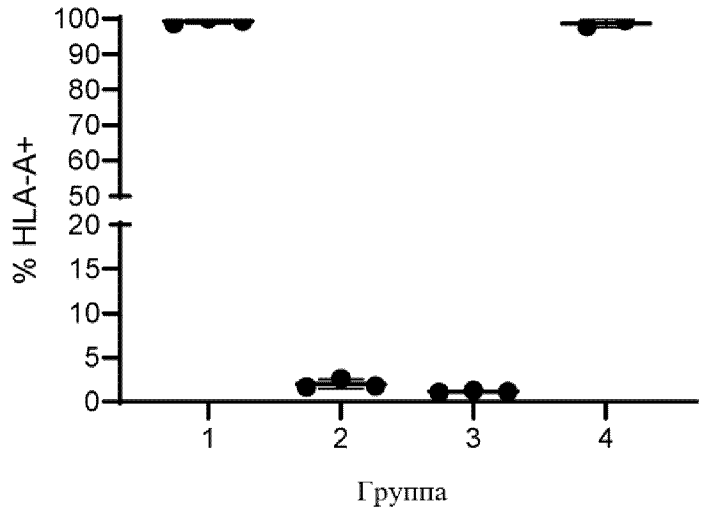
ФИГ. 7D


100
90
80
70
60
50
20
15
10
5
0
% CD3+ Vb8-
1
2
3
4
Группа

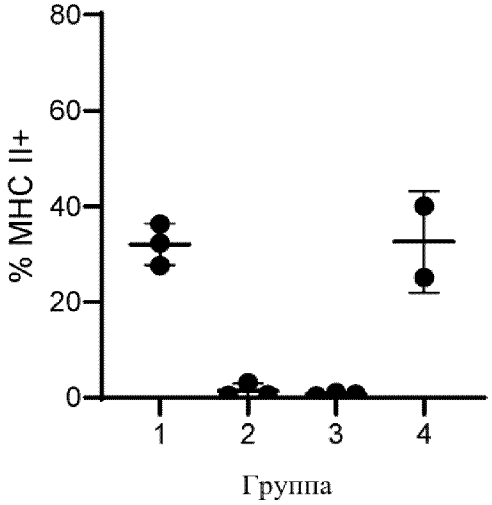
ФИГ. 7E


80
60
40
20
0
% CD3+ Vb8+ HLA-A- MHC II-
1
2
3
4
Группа

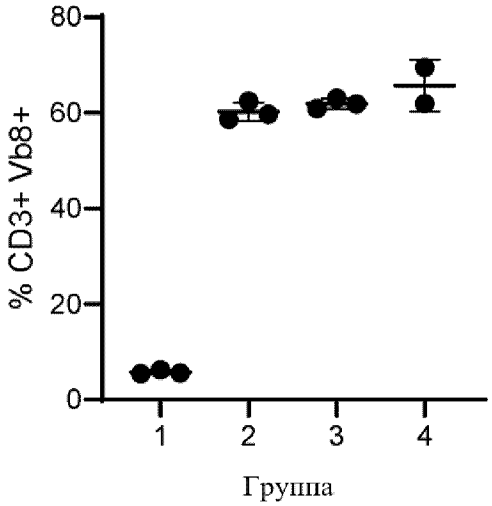
ФИГ. 7F


100
90
80
70
60
50
20
15
10
5
0
% HLA-A+
1
2
3
4
Группа

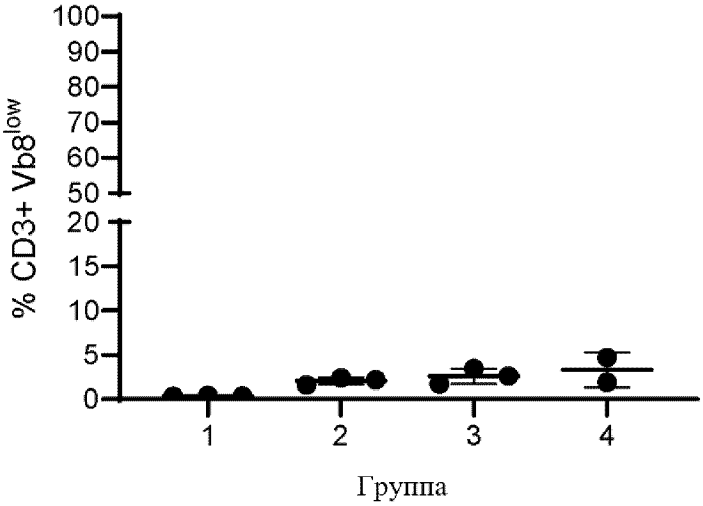
ФИГ. 8А


80
60
40
20
0
% MHC II+
1
2
3
4
Группа

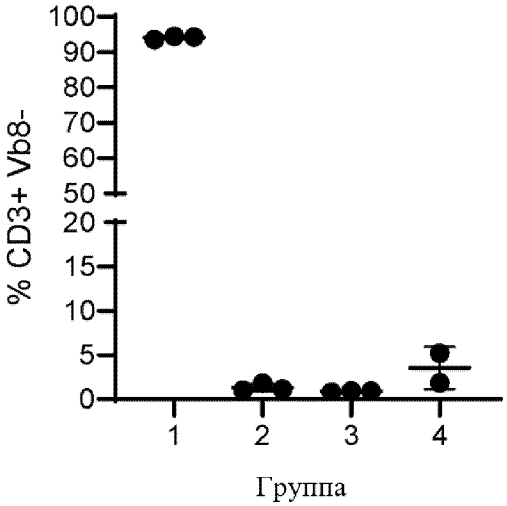
ФИГ. 8В


80
60
40
20
0
% CD3+ Vb8+
1
2
3
4
Группа

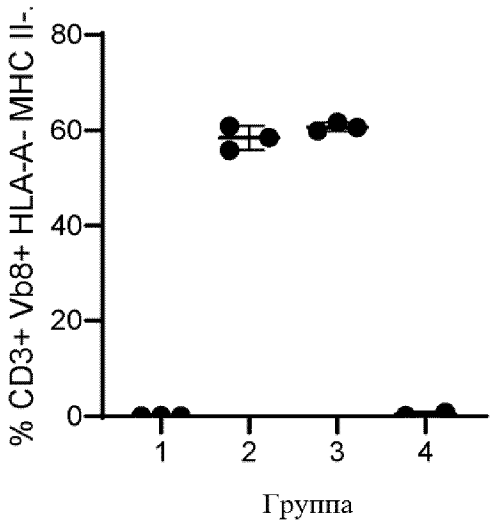
ФИГ. 8C


100
90
80
70
60
50
20
15
10
5
0
% CD3+ Vb8low
1
2
3
4
Группа

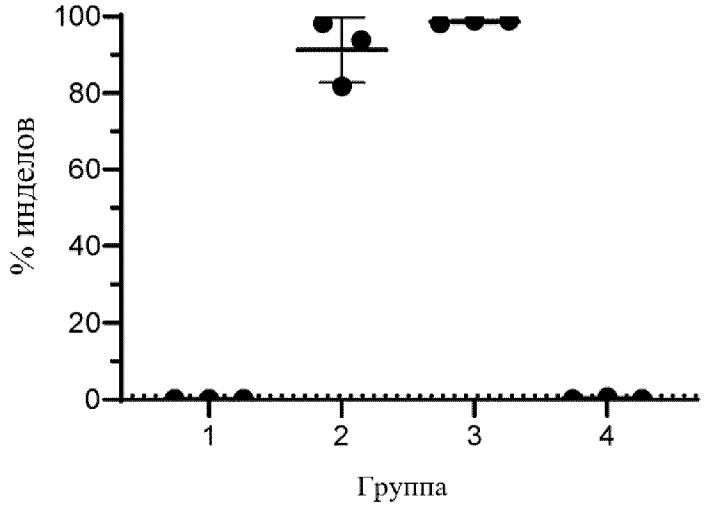
ФИГ. 8D


100
90
80
70
60
50
20
15
10
5
0
% CD3+ Vb8-
1
2
3
4
Группа

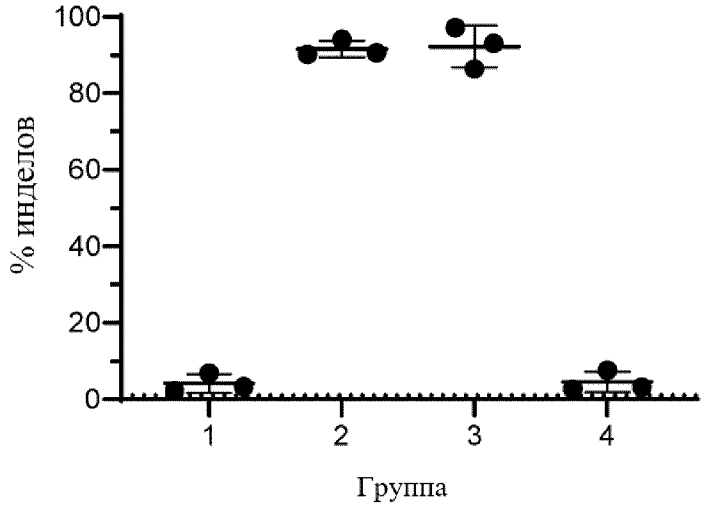
ФИГ. 8E


80
60
40
20
0
% CD3+ Vb8+ HLA-A- MHC II-
1
2
3
4
Группа

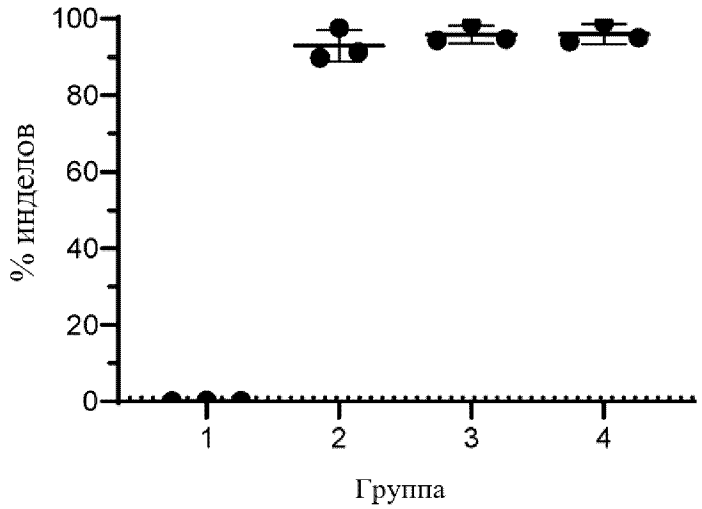
ФИГ. 8F


100
80
60
40
20
0
% инделов
1
2
3
4
Группа

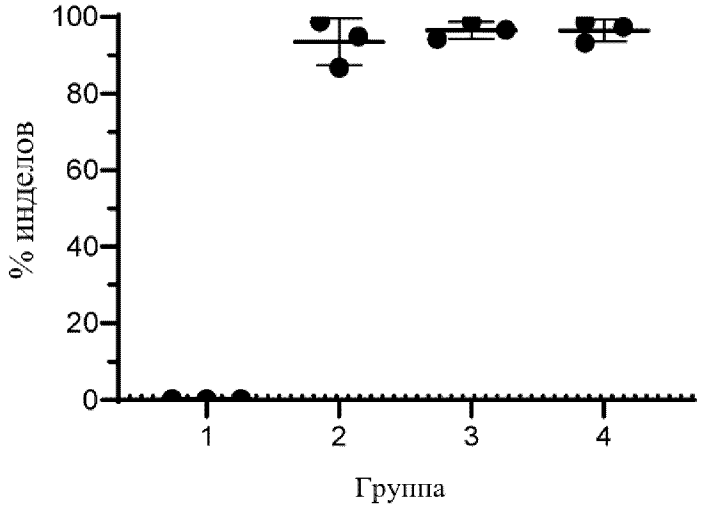
ФИГ. 9А


100
80
60
40
20
0
% инделов
1
2
3
4
Группа

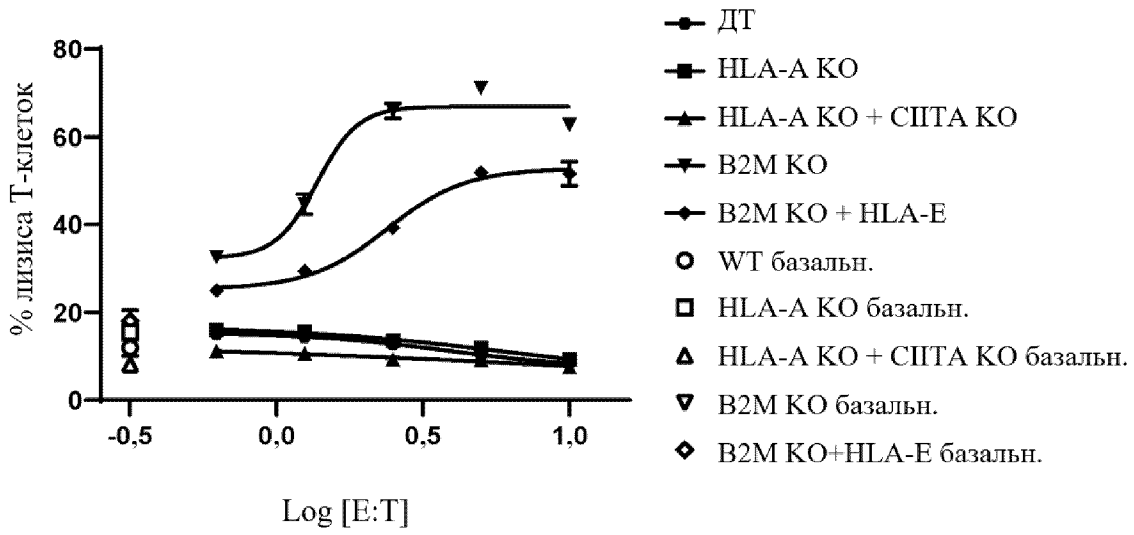
ФИГ. 9В


100
80
60
40
20
0
% инделов
1
2
3
4
Группа

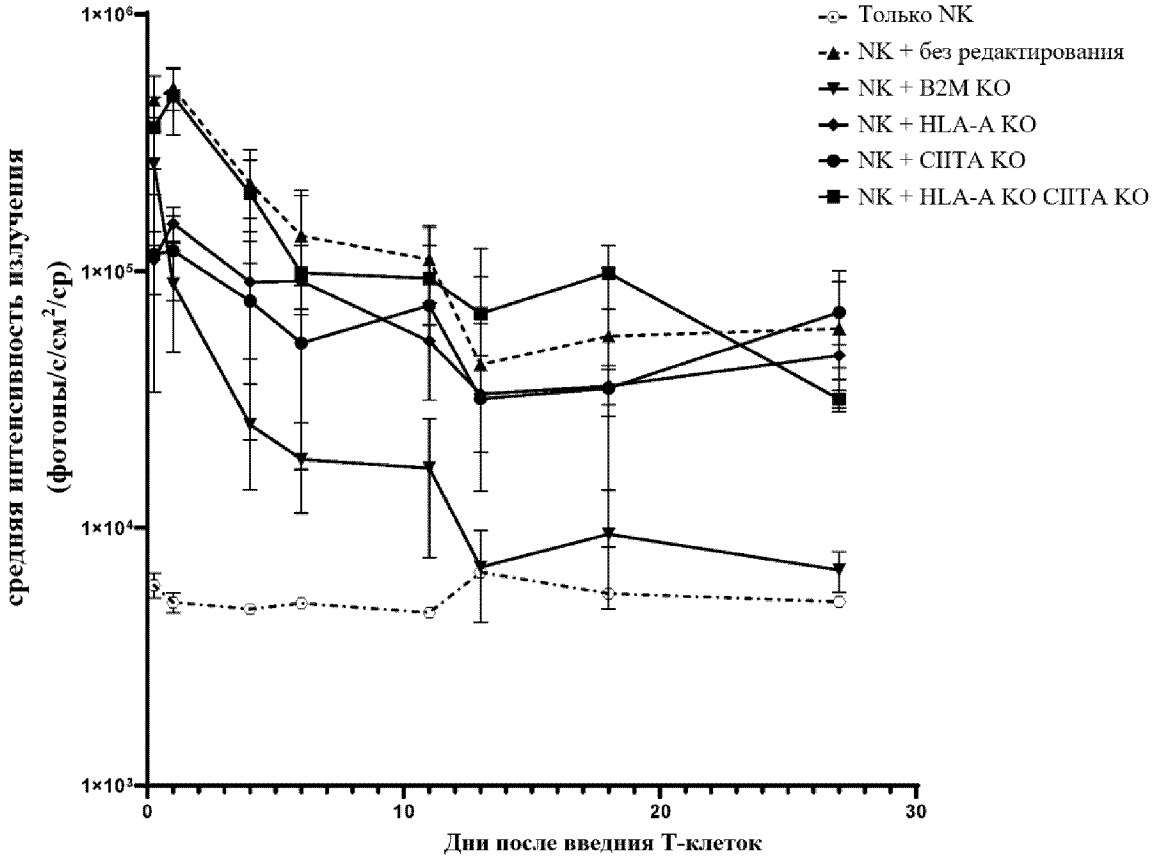
ФИГ. 9C


100
80
60
40
20
0
% инделов
1
2
3
4
Группа

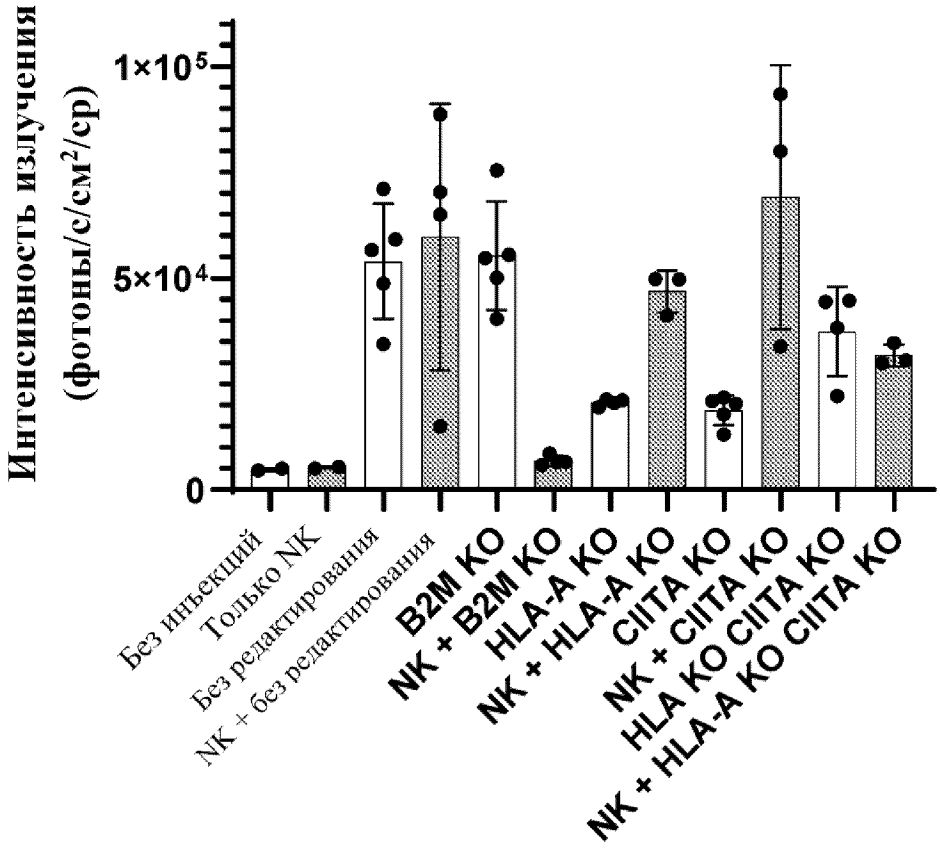
ФИГ. 9D



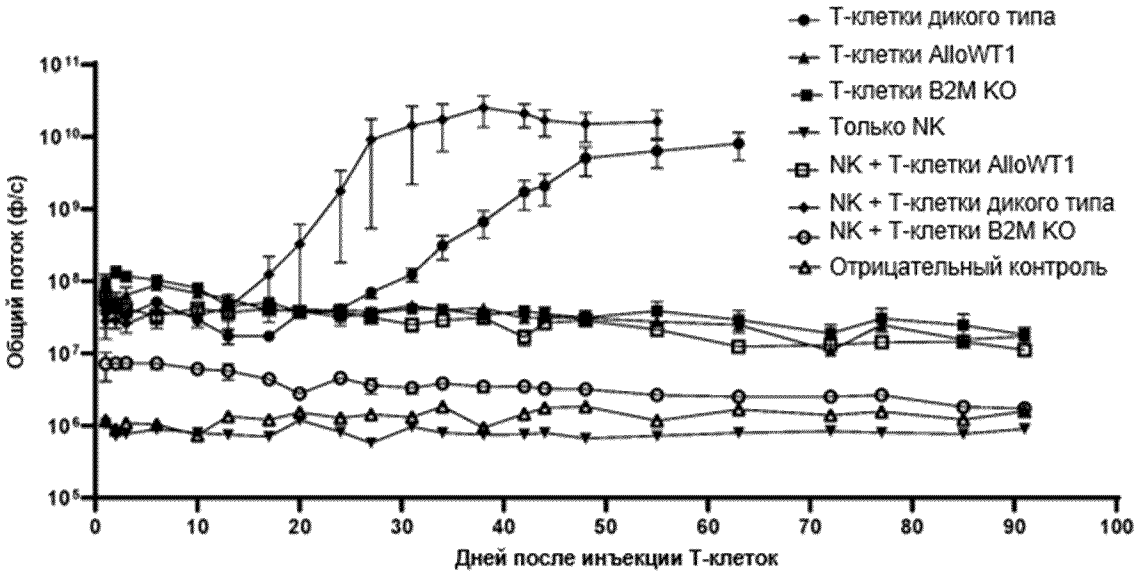
ФИГ. 10



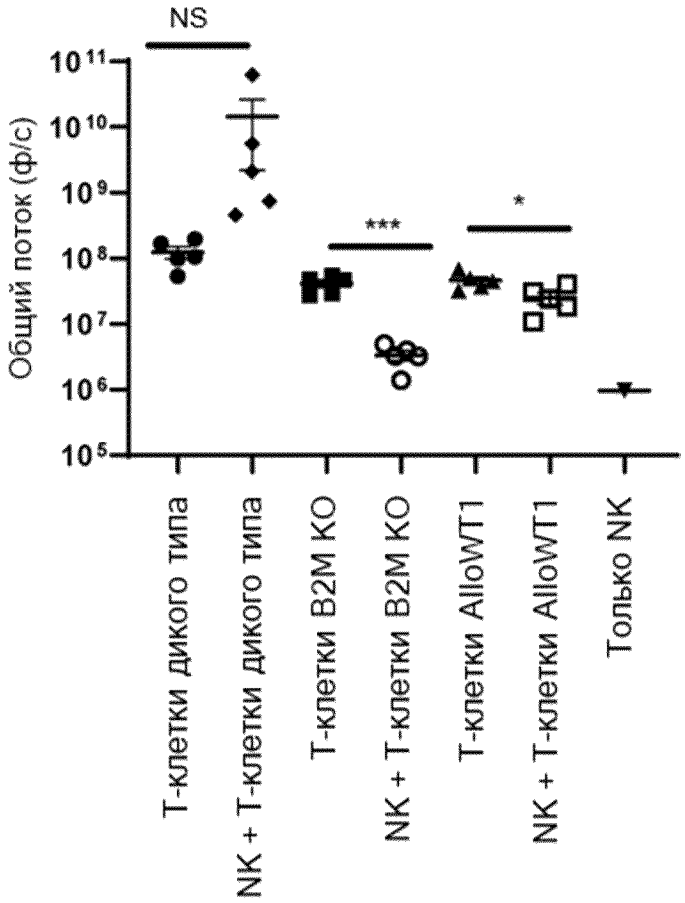
ФИГ. 11А


Интенсивность излучения
(фотоны/с/см²/ср)
1×10⁵
5×10⁴
0
Без инъекций
Только NK
Без редактирования
NK + без редактирования
B2M KO
NK + B2M KO
HLA-A KO
NK + HLA-A KO
CIITA KO
NK + CIITA KO
HLA KO CIITA KO
NK + HLA-A KO CIITA KO

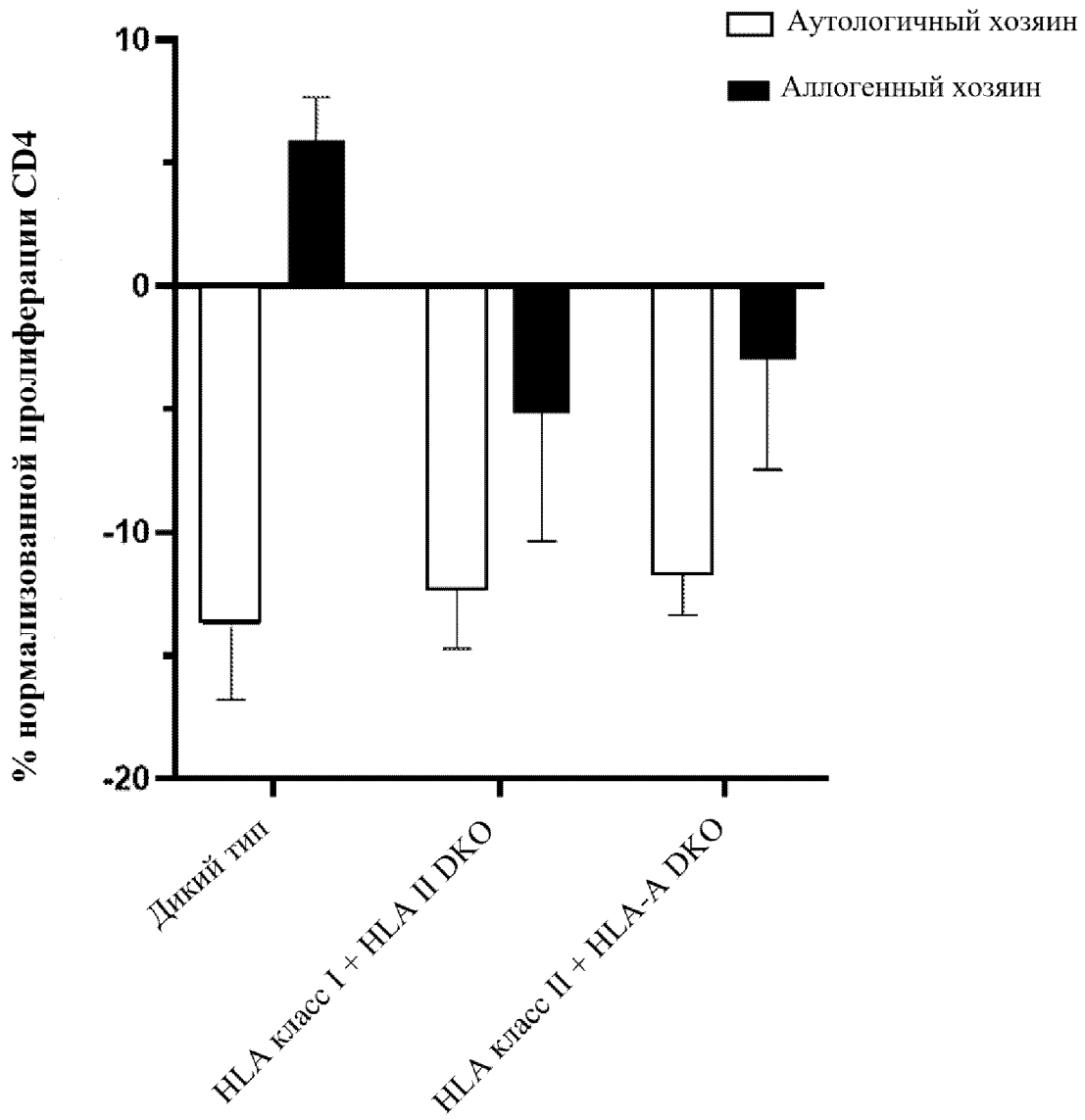
ФИГ. 11B



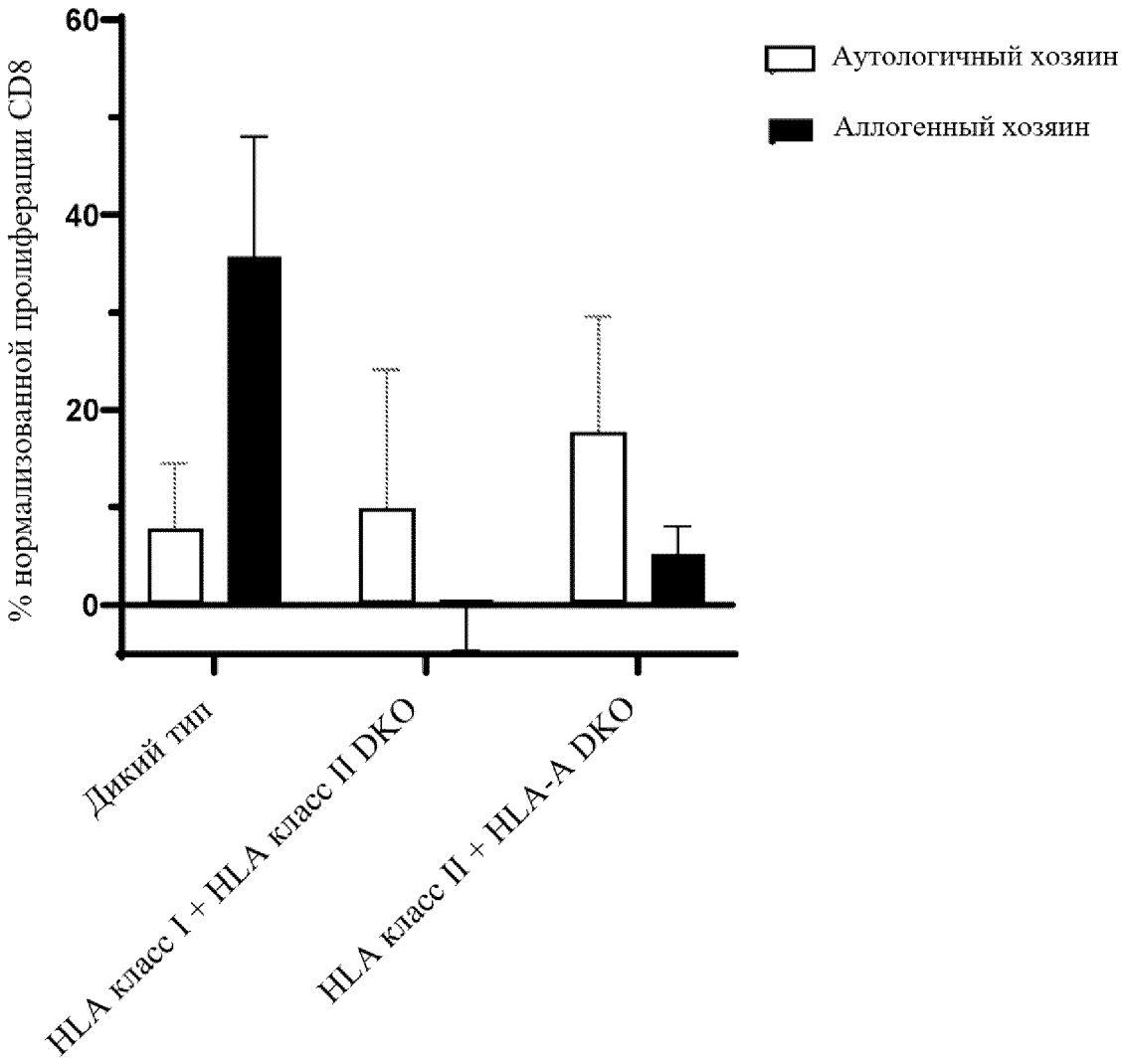
ФИГ. 12A



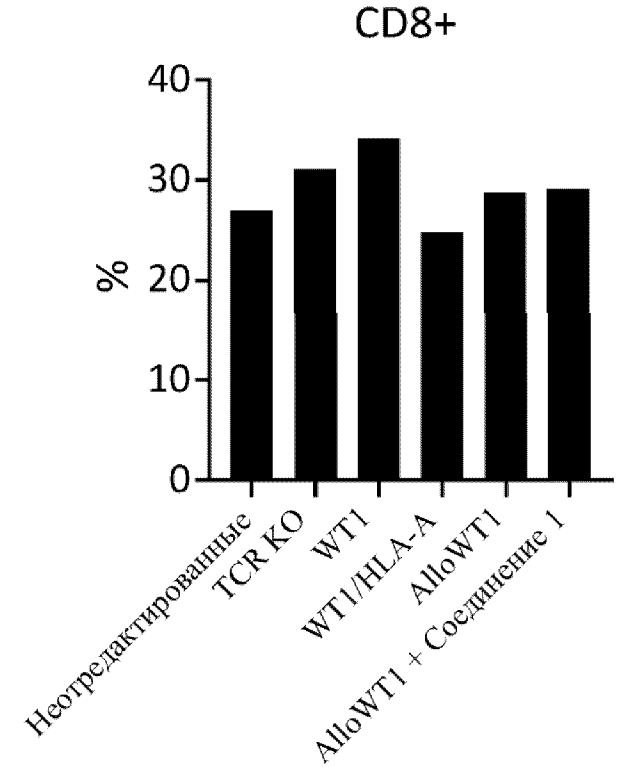
ФИГ. 12B


Аутологичный хозяин
Аллогенный хозяин
% нормализованной пролиферации CD4
10
0
-10
-20
Дикий тип
HLA класс I + HLA II DKO
HLA класс II + HLA-A DKO

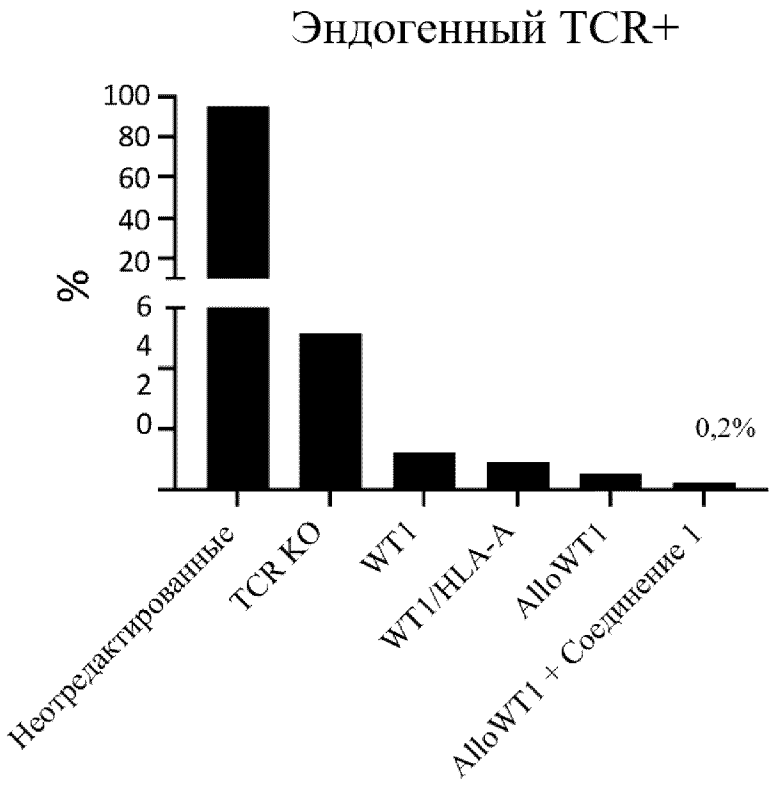
ФИГ. 13А


60
40
20
0
% нормализованной пролиферации CD8
Аутологичный хозяин
Аллогенный хозяин
Дикий тип
HLA класс I + HLA класс II DKO
HLA класс II + HLA-A DKO

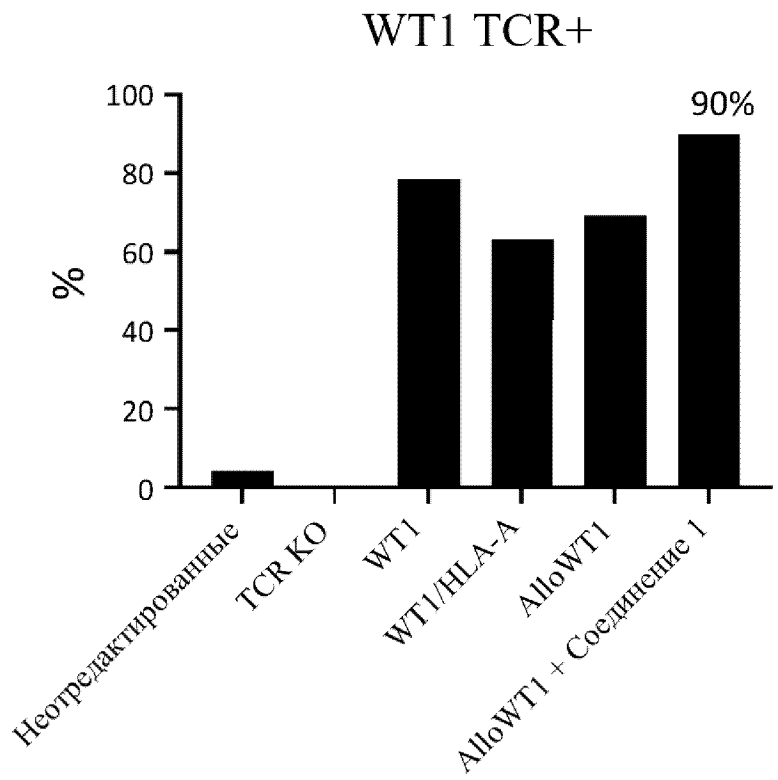
ФИГ. 13B



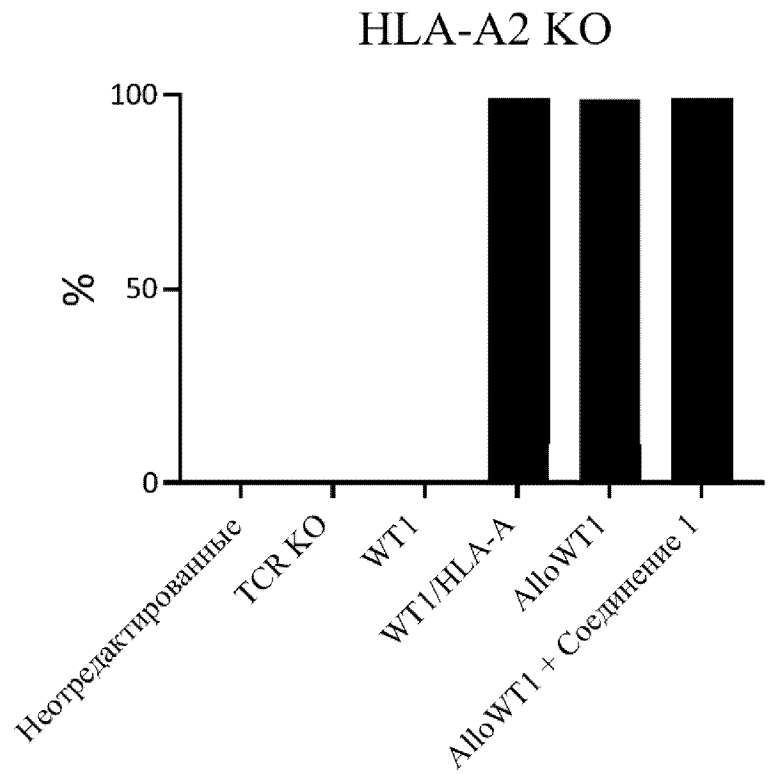
ФИГ. 14A



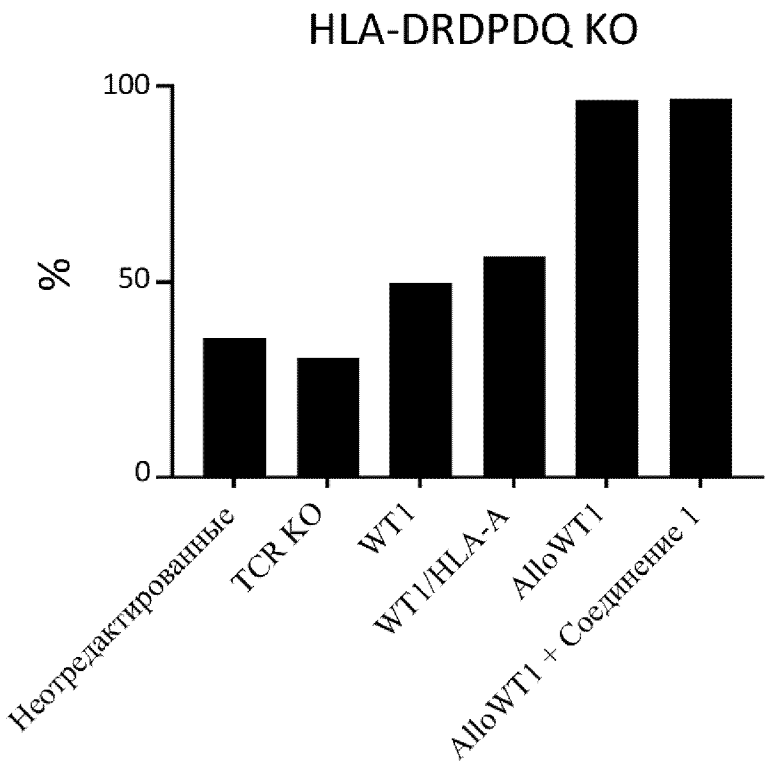
ФИГ. 14B



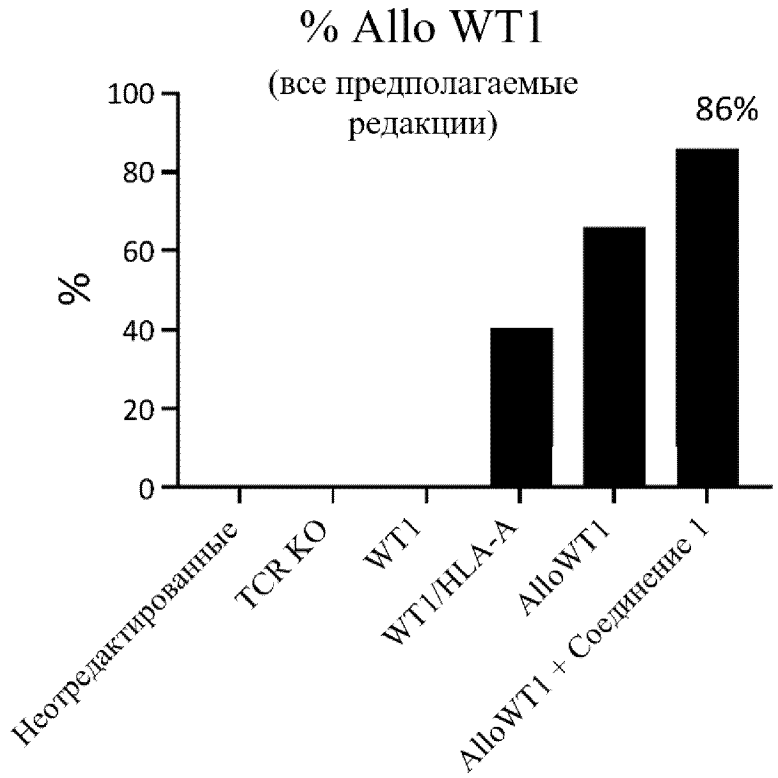
ФИГ. 14C



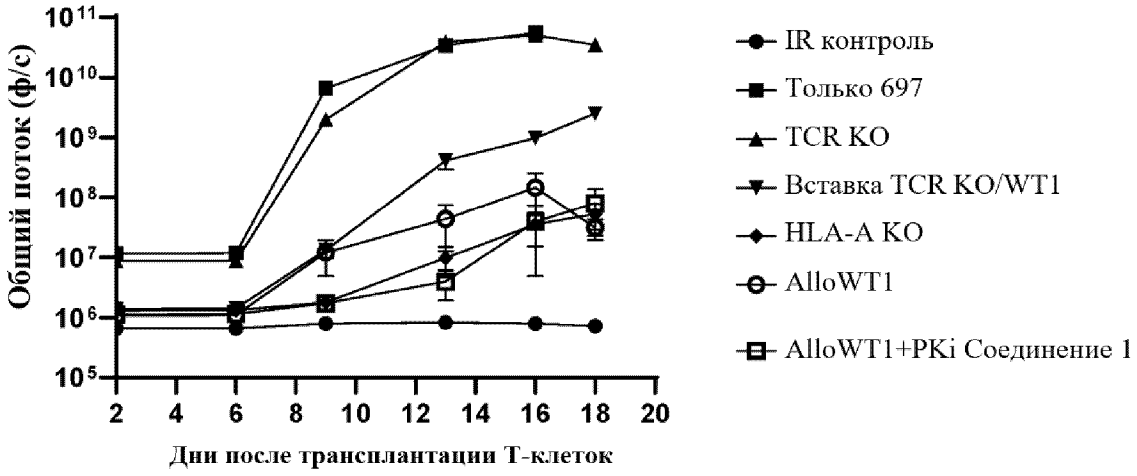
ФИГ. 14D



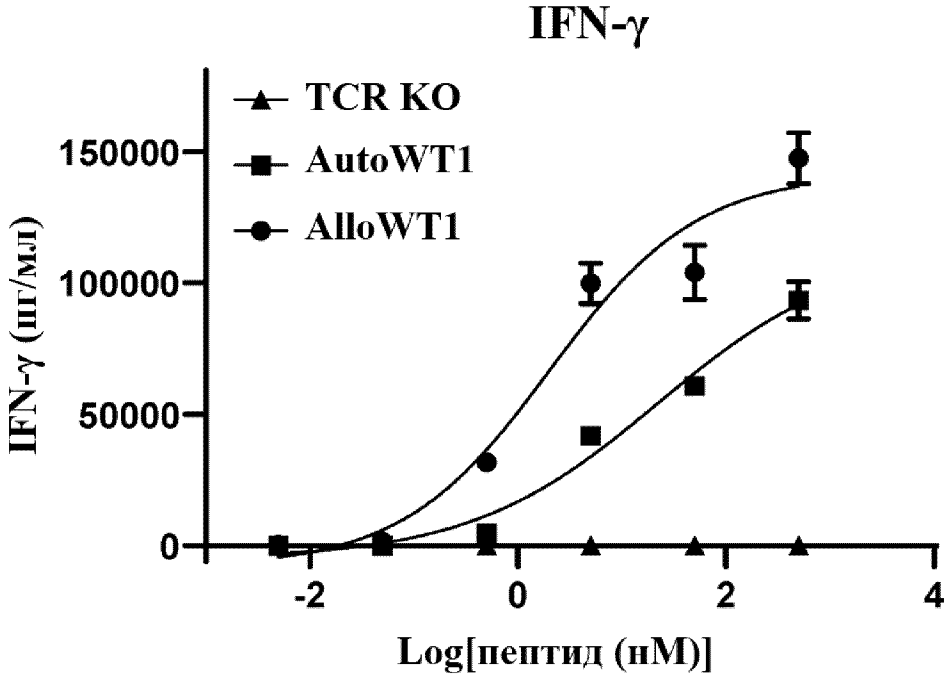
ФИГ. 14E



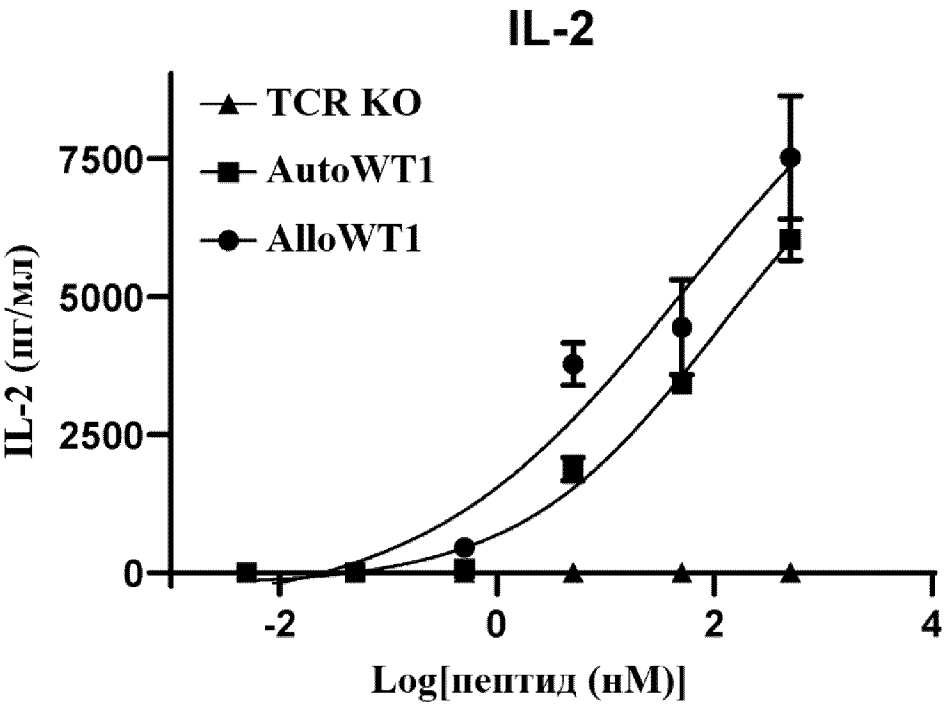
ФИГ. 14F


Общий поток (ф/с)
10^{11}
10^{10}
10^{9}
10^{8}
10^{7}
10^{6}
10^{5}
2 4 6 8 10 12 14 16 18 20
Дни после трансплантации Т-клеток
IR контроль
Только 697
TCR KO
Вставка TCR KO/WT1
HLA-A KO
AlloWT1
AlloWT1+PKi Соединение 1

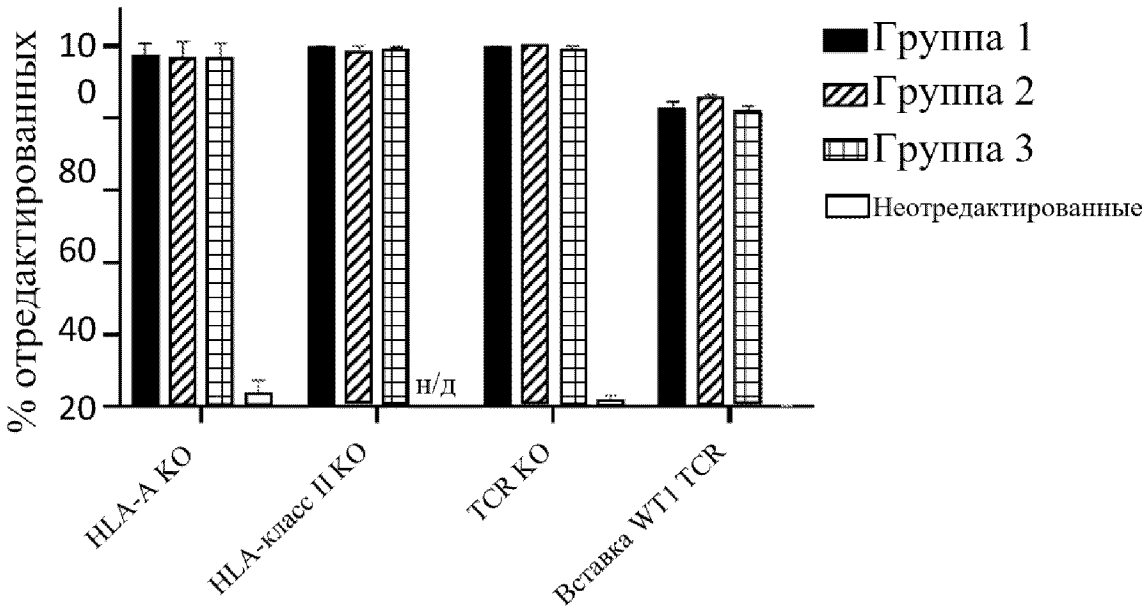
ФИГ. 15



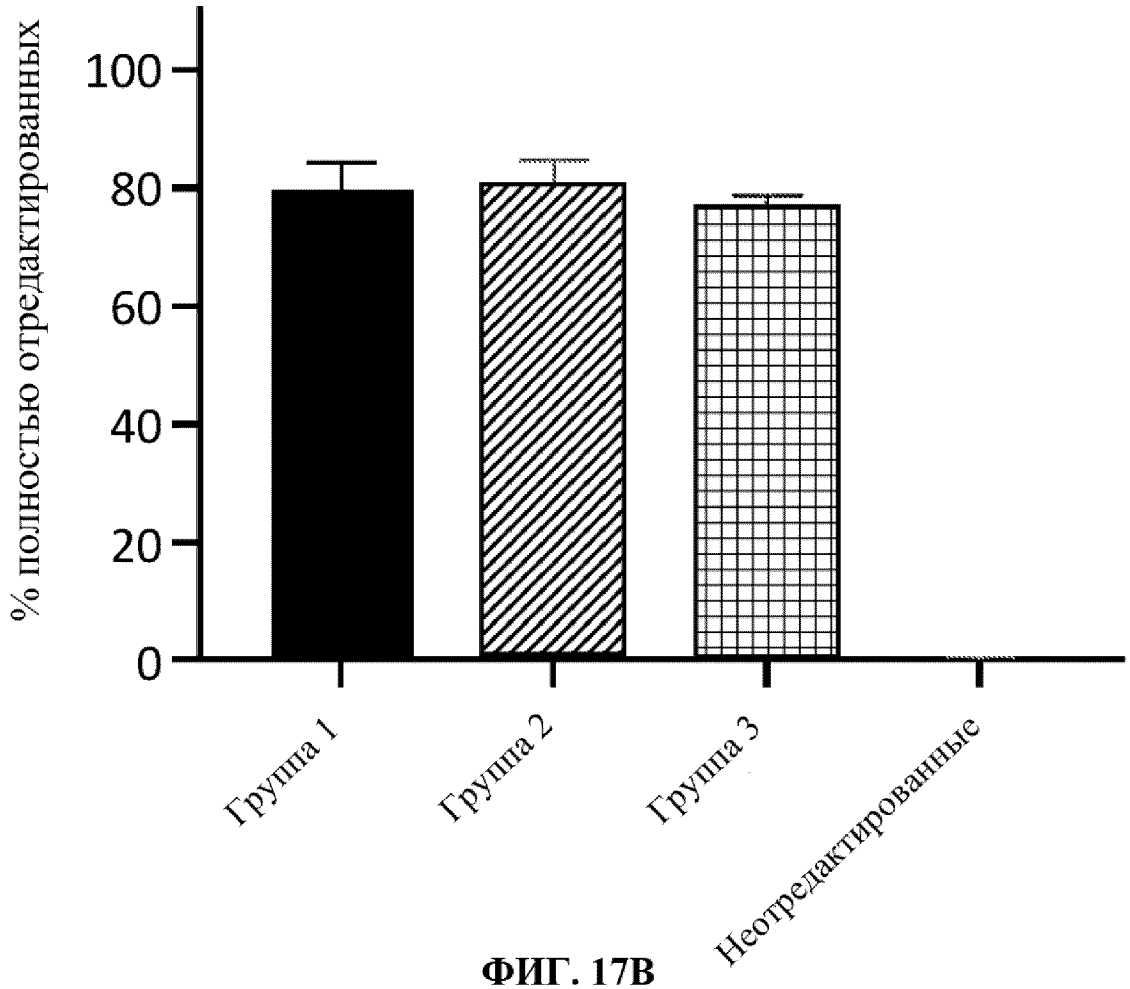
ФИГ. 16А



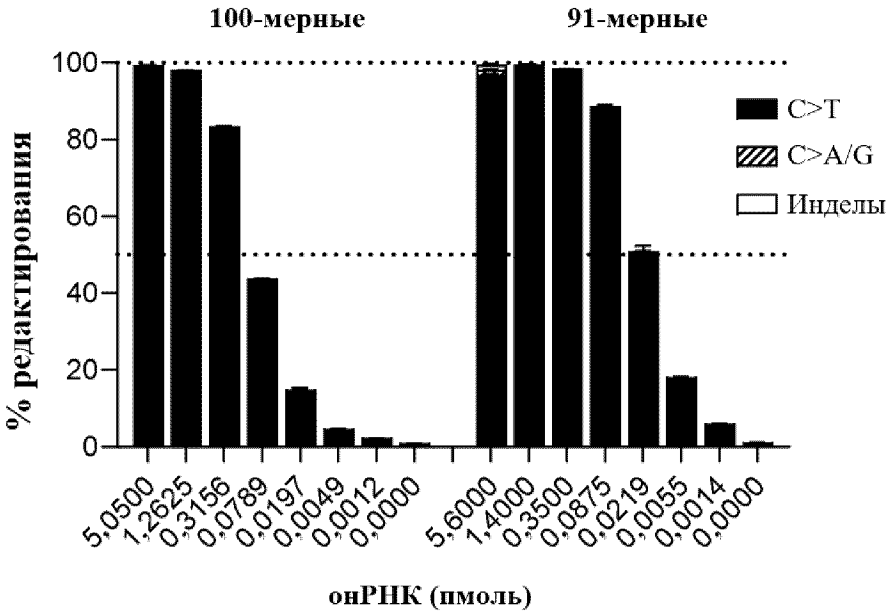
ФИГ. 16В


% отредактированных
10
0
80
60
40
20
н/д
HLA-A KO
HLA-класс II KO
TCR KO
Вставка WT1 TCR
Группа 1
Группа 2
Группа 3
Неотредактированные

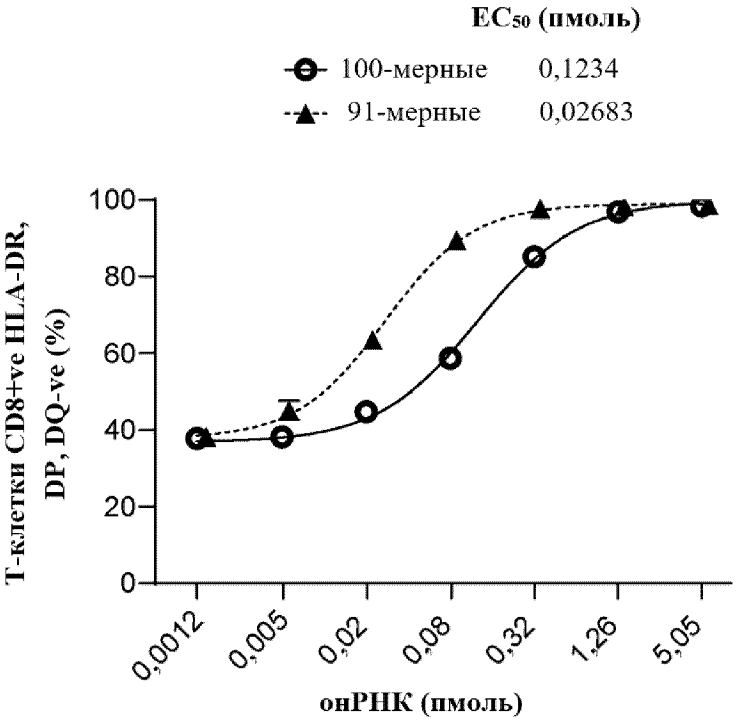
ФИГ. 17A


% полностью отредактированных
100
80
60
40
20
0
Группа 1
Группа 2
Группа 3
Неотредактированные

ФИГ. 17B


100-мерные
91-мерные
% редактирования
100
80
60
40
20
0
C>T
C>A/G
Инделы
5,0500
1,2625
0,3156
0,0789
0,0197
0,0049
0,0012
0,0000
5,6000
1,4000
0,3500
0,0875
0,0219
0,0055
0,0014
0,0000
онРНК (пмоль)

ФИГ. 18


EC50 (пмоль)
100-мерные 0,1234
91-мерные 0,02683
Т-клетки CD8+ve HLA-DR, DP, DQ-ve (%)
100
80
60
40
20
0
0,0012
0,005
0,02
0,08
0,32
1,26
5,05
онРНК (пмоль)

ФИГ. 19