

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **046165**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента  
**2024.02.13**

(21) Номер заявки  
**202290781**

(22) Дата подачи заявки  
**2020.09.04**

(51) Int. Cl. **C12N 5/10** (2006.01)  
**C12N 15/11** (2006.01)  
**A61K 35/12** (2015.01)

**(54) УНИВЕРСАЛЬНЫЕ ДОНОРСКИЕ КЛЕТКИ**

(31) **62/896,473; 62/979,771**

(32) **2019.09.05; 2020.02.21**

(33) **US**

(43) **2022.10.11**

(86) **PCT/IB2020/058281**

(87) **WO 2021/044379 2021.03.11**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:  
**КРИСПР ТЕРАПЬЮТИКС АГ (CH)**

(72) Изобретатель:  
**Резаниа Алиреза, Рамос-Зейес Ребека  
(US)**

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

(56) HAN X. ET AL.: "Generation of hypoimmunogenic human pluripotent stem cells", PROC. NATL. ACAD. SCI., USA, vol. 116, № 21, 30 April 2019 (2019-04-30), p. 10441-10446, XP055640699, ISSN: 0027-8424, DOI: 10.1073/pnas.1902566116, cited in the application, the whole document

GORNALUSSE G.G. ET AL.: "HLA-E-expressing pluripotent stem cells escape allogeneic responses and lysis by NK cells", NATURE BIOTECHNOLOGY, vol. 35, № 8, August 2017 (2017-08), p. 765-772, XP055754630, ISSN: 1087-0156, DOI: 10.1038/nbt.3860, cited in the application

WO-A2-2016183041

WO-A1-2017079673

WO-A1-2018132783

DEVI T.S. ET AL.: "TXNIP regulates mitophagy in retinal Müller cells under high-glucose conditions: implications for diabetic retinopathy", CELL DEATH & DISEASE, vol. 8, № 5, E2777, 11 May 2017 (2017-05-11), XP055754646, DOI: 10.1038/cddis.2017.190, p. 11, -& DEVI T.S. ET AL.: "TXNIP regulates mitophagy in retinal Müller cells under high-glucose conditions: implications for diabetic retinopathy. Supplementary data", CELL DEATH & DISEASE, vol. 8, № 5, 11 May 2017 (2017-05-11), XP055754652, fig. 4S

(57) В изобретении представлены генетически модифицированные клетки, которые совместимы со многими субъектами, например универсальные донорские клетки, и способы получения указанных генетически модифицированных клеток. Универсальные донорские клетки содержат по меньшей мере одну генетическую модификацию в пределах по меньшей мере одного гена, который кодирует фактор выживания, или рядом с ним, где генетическая модификация предусматривает вставку полинуклеотида, кодирующего толерогенный фактор. Универсальные донорские клетки могут дополнительно содержать по меньшей мере одну генетическую модификацию в пределах гена, который кодирует один или несколько человеческих лейкоцитарных антигенов МНС-I или МНС-II, или компонент, или регулятор транскрипции комплекса МНС-I или МНС-II, или рядом с ним, где указанная генетическая модификация предусматривает вставку полинуклеотида, кодирующего второй толерогенный фактор.

**B1****046165****046165 B1**

### **Перекрестная ссылка на родственные заявки**

Настоящая заявка испрашивает приоритет на основании предварительной заявки на патент США № 62/896473, поданной 5 сентября 2019 г., и предварительной заявки на патент США № 62/979771, поданной 21 февраля 2020 г., раскрытия которых тем самым включены посредством ссылки во всей своей полноте.

### **Включение перечня последовательностей посредством ссылки**

Настоящая заявка содержит перечень последовательностей, который был подан в формате ASCII с помощью EFS-Web и тем самым включен посредством ссылки во всей своей полноте. Указанная копия в формате ASCII, созданная 2 сентября 2020 г., имеет название ST124-PT-100867-666508-Sequence-Listing\_ST25.txt, и ее размер составляет приблизительно 53000 байтов.

### **Область техники, к которой относится изобретение**

Настоящее изобретение относится к области редактирования генов и в некоторых вариантах осуществления к генетическим модификациям в целях создания клеток, совместимых с множеством субъектов, например универсальных донорских клеток.

### **Предпосылки изобретения**

Были предложены различные подходы для преодоления аллогенного отторжения трансплантированных или прививаемых клеток, включая HLA-типирование, блокирование сигнальных путей, которые запускают активацию Т-клеток с помощью антител, использование смеси иммуносупрессивных лекарственных средств и аутологичную клеточную терапию. Другая стратегия подавления отторжения трансплантата предусматривает минимизацию аллогенных различий между трансплантируемыми или прививаемыми клетками и реципиентом. Экспрессируемые на поверхности клетки человеческие лейкоцитарные антигены (HLA), молекулы, кодируемые генами, расположенными в главном комплексе гистосовместимости человека на хромосоме 6, являются основными медиаторами иммунного отторжения. Несовместимость одного гена HLA у донора и субъекта может вызвать устойчивый иммунный ответ (Fleischhauer K. et al., "Bone marrow-allograft rejection by T lymphocytes recognizing a single amino acid difference in HLA-B44", N. Engl. J. Med., 1990, 323:1818-1822). Гены HLA подразделяются на MHC класса I (MHC-I) и MHC класса II (MHC-II). Гены MHC-I (HLA-A, HLA-B и HLA-C) экспрессируются практически во всех типах клеток тканей, презентующих "не являющиеся своими" антигенпроцессированные пептиды CD8<sup>+</sup> Т-клеткам, тем самым способствуя их активации до цитолитической CD8<sup>+</sup> Т-клетки. Трансплантированные или привитые клетки, экспрессирующие "не являющиеся своими" молекулы MHC-I, будут вызывать устойчивый клеточный иммунный ответ, направленный на эти клетки и в конечном итоге приводящий к их гибели под действием активированных цитолитических CD8<sup>+</sup> Т-клеток. Белки MHC-I тесно связаны с бета-2-микроглобулином (B2M) в эндоплазматическом ретикулуме, что важно для образования функциональных молекул MHC-I на поверхности клетки.

В отличие от повсеместной клеточной экспрессии генов MHC-I, экспрессия генов MHC-II ограничена антигенпрезентирующими клетками, такими как дендритные клетки, макрофаги и В-клетки. Гены антигена HLA являются наиболее полиморфными генами, наблюдаемыми в геноме человека (Rubinstein P., "HLA matching for bone marrow transplantation--how much is enough?", N. Engl. J. Med., 2001, 345:1842-1844). Создание "универсальной донорской" клетки, совместимой с любым генотипом HLA, обеспечивает альтернативную стратегию, которая может устранить иммунное отторжение и связанные с этим экономические затраты на существующие методологии для ускользания от иммунного надзора.

Один из предыдущих подходов для создания такой линии универсальной(ых) донорской(их) клетки(ок) заключался в функциональном нарушении экспрессии генов классов MHC-I и MHC-II. Этого можно достичь посредством генетического нарушения, например, обоих генетических аллелей, кодирующих легкую цепь MHC-I, B2M. Предполагают, что полученная в результате линия клеток, являющихся нулевыми по B2M, и ее производные будут демонстрировать значительно сниженную экспрессию поверхностного MHC-I и, таким образом, сниженную иммуногенность по отношению к аллогенным CD8<sup>+</sup> Т-клеткам. Подход нацеливания эффекторной нуклеазы, подобной активатору транскрипции (TALEN), был использован для создания B2M-дефектных линий hESC путем делеции нескольких нуклеотидов в экзоне 2 гена B2M (Lu, P. et al., "Generating hypoimmunogenic human embryonic stem cells by the disruption of beta 2-microglobulin", Stem. Cell Rev., 2013, 9:806-813). Хотя линии hESC, нацеленные на B2M, оказались с дефицитом поверхностного HLA-I, обнаружили, что они по-прежнему содержат мРНК, специфические для B2M и MHC-I. мРНК B2M и MHC-I экспрессировались на уровнях, эквивалентных уровням нецелевых hESC (как конститутивных, так и индуцированных IFN-g). Таким образом, существует опасение того, что эти линии hESC, TALEN-нацеленными B2M, могут экспрессировать остаточный MHC-I клеточной поверхности, которого было бы достаточно, чтобы вызвать иммунное отторжение, что наблюдали с клетками мышей B2M2/2, которые также экспрессируют мРНК B2M (Gross, R., Rappuoli, R. "Pertussis toxin promoter sequences involved in modulation", Proc. Natl. Acad. Sci., 1993, 90:3913-3917). Хотя линии hESC с TALEN-нацеленными B2M, не исследовали на предмет событий нецелевого расщепления, возникновение неспецифического

расщепления при использовании TALEN остается серьезной проблемой, которая может вызвать серьезное беспокойство по поводу безопасности их клинического применения (Grau, J. et al., "TALENoffer: genome-wide TALEN off-target prediction", *Bioinformatics*, 2013, 29:2931-2932; Guilinger J.P. et al., "Broad specificity profiling of TALENs results in engineered nucleases with improved DNA-cleavage specificity", *Nat. Methods.*, 2014, 11:429-435). Кроме того, в другом отчете сообщали о создании клеток IPS, которые ускользали от аллогенного распознавания за счет нокаута первого аллеля В2М и нокина гена HLA-E на втором аллеле В2М, что привело к поверхностной экспрессии димеров или тримеров HLA-E в отсутствие поверхностной экспрессии HLA-A, HLA-B или HLA-C (Gornalusse, G.G. et al., "HLA-E-expressing pluripotent stem cells escape allogeneic responses and lysis by NK cells", *Nature Biotechnology*, 2017, 35, 765-773).

Потенциальным ограничением некоторых из упомянутых выше стратегий является то, что клетки, негативные по МНС класса I, чувствительны к лизису естественными клетками-киллерами (NK), поскольку молекулы HLA служат основными ингибиторами лигандов для естественных клеток-киллеров (NK). Было показано, что клетки-хозяева NK устраняют трансплантированные или привитые В2М-/- донорские клетки, и аналогичное явление происходит *in vitro* с негативными по МНС класса I лейкозными линиями человека (Bix, M. et al., "Rejection of class I MHC-deficient haemopoietic cells by irradiated MHC-matched mice", *Nature*, 1991, 349, 329-331; Zarcone, D. et al., "Human leukemia-derived cell lines and clones as models for mechanistic analysis of natural killer cell-mediated cytotoxicity", *Cancer Res.*, 1987, 47, 2674-2682). Таким образом, существует потребность в улучшении предыдущих способов создания универсальных донорских клеток, которые могут ускользать от иммунного ответа, а также потребность в создании клеток, которые могут выживать после приживления трансплантата. В данном изобретении описывается, что выживаемость клеток после приживления трансплантата может быть опосредована множеством других сигнальных путей, независимых от аллогенного отторжения, например, гипоксией, активными формами кислорода, депривацией питательных веществ и окислительным стрессом. Также в данном изобретении описывается, что генетическое введение факторов выживания (генов и/или белков) может помочь клеткам выжить после приживления трансплантата. Как описывается в данном изобретении, линия универсальных донорских клеток может сочетать в себе свойства, направленные как на аллогенное отторжение, так и на выживание после приживления трансплантата.

#### Краткое описание

В некоторых аспектах настоящее изобретение охватывает способ получения универсальной донорской клетки. Способ включает доставку в клетку (а) сайт-направленной нуклеазы, нацеленной на сайт в пределах гена, кодирующего фактор выживания, или рядом с ним; и (б) нуклеиновой кислоты, содержащей нуклеотидную последовательность, кодирующую толерогенный фактор, которая фланкирована (i) нуклеотидной последовательностью, гомологичной участку, расположенному слева от целевого сайта из (а), и (ii) нуклеотидной последовательностью, гомологичной участку, расположенному справа от целевого сайта из (а), где сайт-направленная нуклеаза расщепляет целевой сайт из (а) и нуклеиновая кислота из (б) вставляется в сайт, который частично перекрывает сайт из (а), полностью перекрывает его или содержится в нем, с обеспечением таким образом получения универсальной донорской клетки, где универсальная донорская клетка характеризуется повышенной выживаемостью клеток по сравнению с клеткой, в которую не была вставлена нуклеиновая кислота из (б).

В некоторых вариантах осуществления фактор выживания представляет собой TXNIP, ZNF143, FOXO1, JNK или MANF, а толерогенный фактор представляет собой PD-L1, HLA-E, HLA-G, CTLA-4 или CD47. В конкретных вариантах осуществления фактор выживания представляет собой TXNIP, а толерогенный фактор представляет собой HLA-E. В вариантах осуществления, в которых сайт-направленная нуклеаза представляет собой систему CRISPR, содержащую CRISPR-нуклеазу и направляющую РНК (gRNA), CRISPR-нуклеаза представляет собой нуклеазу Cas9 типа II или нуклеазу Cpf1 типа V, и CRISPR-нуклеаза связана с по меньшей мере одним сигналом ядерной локализации. В некоторых вариантах осуществления gRNA нацелена на полинуклеотидную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 15-24 или 45-54, и (i) состоит по сути из нуклеотидной последовательности под SEQ ID NO: 25; и (ii) состоит по сути из нуклеотидной последовательности под SEQ ID NO: 32.

В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно предусматривает доставку в клетку (с) сайт-направленной нуклеазы, нацеленной на сайт в пределах гена, который кодирует один или несколько человеческих лейкоцитарных антигенов МНС-I или МНС-II, или компонент, или регулятор транскрипции комплекса МНС-I или МНС-II, или рядом с ним, и (d) нуклеиновой кислоты, содержащей нуклеотидную последовательность, кодирующую толерогенный фактор, которая фланкирована (iii) нуклеотидной последовательностью, гомологичной участку, расположенному слева от целевого сайта из (с), и (iv) нуклеотидной последовательностью, гомологичной участку, расположенному справа от целевого сайта из (с), где толерогенный фактор из (d) отличается от толерогенного фактора (b), при этом сайт-направленная нуклеаза расщепляет целевой сайт из (с) и нуклеиновая кислота из (d) вставляется в сайт, который частично перекрывает сайт из (с), полностью перекрывает его или содержится в нем, при этом универсальная донорская клетка характеризуется повышенной способностью к ускользанию от иммунного надзора и/или выживаемостью клеток по сравнению с клеткой, в которую не была вставлена

нуклеиновая кислота из (d).

В некоторых вариантах осуществления ген, который кодирует один или несколько человеческих лейкоцитарных антигенов МНС-I или МНС-II, или компонент, или регулятор транскрипции комплекса МНС-I или МНС-II, представляет собой ген МНС-I, выбранный из HLA-A, HLA-B или HLA-C, ген МНС-I, выбранный из HLA-DP, HLA-DM, HLA-DOA, HLA-DOB, HLA-DQ или HLA-DR, или ген, выбранный из B2M, NLRC5, CIITA, RFX5, RFXAP или RFXANK, и толерогенный фактор представляет собой PD-L1, HLA-E, HLA-G, CTLA-4 или CD47. В конкретных вариантах осуществления ген, который кодирует один или несколько человеческих лейкоцитарных антигенов МНС-I или МНС-II, или компонент, или регулятор транскрипции комплекса МНС-I или МНС-II, представляет собой B2M, а толерогенный фактор представляет собой PD-L1. В вариантах осуществления, в которых сайт-направленная нуклеаза представляет собой систему CRISPR, содержащую CRISPR-нуклеазу и gRNA, при этом CRISPR-нуклеаза представляет собой нуклеазу Cas9 типа II или нуклеазу Cpf1 типа V, и CRISPR-нуклеаза связана с по меньшей мере одним сигналом ядерной локализации. В некоторых вариантах осуществления gRNA нацелена на полинуклеотидную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1-3 или 35-44, и (iii) состоит по сути из нуклеотидной последовательности под SEQ ID NO: 7, и (iv) состоит по сути из нуклеотидной последовательности под SEQ ID NO: 13.

В некоторых вариантах осуществления нуклеотидная последовательность, кодирующая толерогенный фактор из (b) и (d), функционально связана с экзогенным промотором. Экзогенный промотор может быть выбран из конститутивного, индуцируемого, времяспецифического, тканеспецифического или клеточноспецифического промотора. В некоторых вариантах осуществления экзогенный промотор представляет собой промотор CMV, EF1a, PGK, CAG или UBC. В конкретных вариантах осуществления экзогенный промотор представляет собой промотор CAG.

Настоящее изобретение также охватывает универсальные донорские клетки, полученные с помощью раскрытых в данном изобретении способов. В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой клетку млекопитающего. В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой клетку человека. В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой стволовую клетку. В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой плюрипотентную стволовую клетку (PSC), эмбриональную стволовую клетку (ESC), стволовую клетку взрослого организма (ASC), индуцированную плюрипотентную стволовую клетку (iPSC) или гемопоэтическую стволовую клетку и клетку-предшественника (HSPC) (также называемую гемопоэтической стволовой клеткой (HSC)). В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой дифференцированную клетку. В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой соматическую клетку.

В целом раскрытые в данном изобретении универсальные донорские клетки способны дифференцироваться в линиеспецифические клетки-предшественники или полностью дифференцированные соматические клетки. В некоторых вариантах осуществления линиеспецифические клетки-предшественники представляют собой предшественники энтодермальной части поджелудочной железы, предшественники эндокринной части поджелудочной железы, мезенхимальные клетки-предшественники, мышечные клетки-предшественники, blastные клетки, гемопоэтические клетки-предшественники или нервные клетки-предшественники, а полностью дифференцированные соматические клетки представляют собой эндокринные секреторные клетки, такие как бета-клетки поджелудочной железы, эпителиальные клетки, энтодермальные клетки, макрофаги, гепатоциты, адипоциты, клетки почки, клетки крови или клетки иммунной системы. В некоторых вариантах осуществления полностью дифференцированные соматические клетки представляют собой кардиомиоциты.

Дополнительный аспект настоящего изобретения предусматривает способ лечения субъекта, нуждающегося в этом, где способ включает получение или обеспечение получения универсальных донорских клеток, раскрытых в данном изобретении, после дифференцировки в линиеспецифические клетки-предшественники или полностью дифференцированные соматические клетки, и введение линиеспецифических клеток-предшественников или полностью дифференцированных соматических клеток субъекту. Также предусмотрен способ получения клеток для введения субъекту, нуждающемуся в этом, при этом способ включает получение или обеспечение получения универсальных донорских клеток, раскрытых в данном изобретении, и поддержание универсальных донорских клеток в течение времени и в условиях, достаточных для того, чтобы клетки дифференцировались в линиеспецифические клетки-предшественники или полностью дифференцированные соматические клетки. В некоторых вариантах осуществления субъект представляет собой человека, у которого имеется заболевание, есть подозрение на его наличие или риск его возникновения. В некоторых вариантах осуществления заболевание представляет собой генетически наследуемое заболевание.

Еще один аспект настоящего изобретения охватывает gRNA, нацеленную на полинуклеотидную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 15-24 или 45-54.

Хотя настоящее изобретение допускает различные модификации и альтернативные формы, его конкретные варианты осуществления показаны в качестве примера в графических материалах и будут подробно описаны в данном изобретении. Однако следует учитывать, что представленные в данном

изобретении графические материалы и подробное описание не предназначены для ограничения настоящего изобретения конкретными раскрытыми вариантами осуществления, а напротив, целью является охват всех модификаций, эквивалентов и альтернатив, подпадающих под суть и объем настоящего изобретения, определяемый прилагаемой формулой изобретения.

Другие признаки и преимущества настоящего изобретения станут очевидными из следующего подробного описания вариантов осуществления настоящего изобретения со ссылкой на прилагаемые графические материалы.

#### **Краткое описание графических материалов**

На фиг. 1 показан анализ TIDE разрезания B2M с использованием gRNA в клетках СуТ49. Тестировали gRNA для B2M-1, B2M-2 и B2M-3.

На фиг. 2A, 2B показана оценка посредством проточной цитометрии экспрессии B2M с IFN- $\gamma$  и без IFN- $\gamma$  в клетках СуТ49 WT (фиг. 2A) и клетках B2M KO СуТ49 (фиг. 2B).

На фиг. 3 показана плазмидная карта вектора-донора для HDR, B2M-CAGGS-PD-L1.

На фиг. 4 показаны результаты осуществленного с помощью проточной цитометрии анализа стволовых клеток B2M KO/PD-L1 KI СуТ49 в отношении их на плюрипотентности. Полученные клоны были на >99% дважды положительными по OCT4 и SOX2, двум факторам транскрипции, критически важным для обеспечения плюрипотентности. IgG использовали в качестве отрицательного контроля.

На фиг. 5A, 5B показаны результаты осуществленного с помощью проточной цитометрии анализа СуТ49 WT (фиг. 5A) и полученных из стволовых клеток клонов B2M KO/PD-L1 KI (фиг. 5B). В клетках WT повышается экспрессия B2M в ответ на IFN $\gamma$ . Клоны B2M KO/PD-L1 KI полностью экспрессируют PD-L1 и не экспрессируют B2M с обработкой IFN $\gamma$  или без нее NT-1=без обработки. INTG-1=клетки, обработанные 50 нг/мл IFN $\gamma$  в течение 48 ч.

На фиг. 6 показаны результаты проточной цитометрии по FOXA2 и SOX17 для клеток на стадии 1 (дефинитивная энтодерма), дифференцированных из клеток СуТ49 дикого типа, PD-L1 KI/B2M KO или B2M KO СуТ49.

На фиг. 7 показаны результаты количественного определения процентного значения экспрессии FOXA2 и SOX17 для клеток на стадии 1 (дефинитивная энтодерма), дифференцированных из клеток дикого типа, PD-L1 KI/B2M KO или B2M KO.

На фиг. 8 показаны результаты количественного определения процентного значения экспрессии CHGA, PDX1 и NKX6.1 для клеток на стадии 4 (PEC), дифференцированных из клеток дикого типа, PD-L1 KI/B2M KO или B2M KO.

На фиг. 9 показаны гетерогенные популяции клеток на стадии 4 (PEC).

На фиг. 10 показана экспрессия выбранных генов в зависимости от времени дифференцировки в клетках, дифференцированных из клеток дикого типа, PD-L1 KI/B2M KO или B2M KO.

На фиг. 11A-11F показана экспрессия выбранных генов в зависимости от времени дифференцировки в клетках, дифференцированных из клеток дикого типа, PD-L1 KI/B2M KO или B2M KO. На фиг. 11A показана экспрессия B2M в клетках дикого типа. На фиг. 11B показана экспрессия B2M в клетках B2M KO. На фиг. 11C показана экспрессия B2M в клетках PD-L1 KI/B2M KO. На фиг. 11D показана экспрессия PD-L1 в клетках дикого типа. На фиг. 11E показана экспрессия PD-L1 в клетках B2M KO. На фиг. 11F показана экспрессия PD-L1 в клетках PD-L1 KI/B2M KO.

На фиг. 12A-12F показана экспрессия МНС класса I и класса II на стадии PEC в клетках, дифференцированных из клеток дикого типа, PD-L1 KI/B2M KO или B2M KO. На фиг. 12A показана экспрессия МНС класса I в клетках дикого типа. На фиг. 12B показана экспрессия МНС класса I в клетках B2M KO. На фиг. 12C показана экспрессия МНС класса I в клетках PD-L1 KI/B2M KO. На фиг. 12D показана экспрессия МНС класса II PD-L1 в клетках дикого типа. На фиг. 12E показана экспрессия МНС класса II в клетках B2M KO. На фиг. 12F показана экспрессия МНС класса II в клетках PD-L1 KI/B2M KO.

На фиг. 13 показан анализ TIDE для разрезания TXNIP с использованием gRNA в hiPSC TC1133. Направляющая последовательность T5 оказалась наилучшей при использовании для разрезания экзона 1.

На фиг. 14 показана плазмидная карта вектора-донора для HDR TXNIP-CAGGS-HLA-E.

На фиг. 15 показаны результаты осуществленного с помощью проточной цитометрии анализа стволовых клеток B2M KO/PD-L1 KI и TXNIP KO/HLA-E KI СуТ49 в отношении их плюрипотентности. Полученные клоны были на >99% дважды положительными по OCT4 и SOX2, двум факторам транскрипции, критически важным для обеспечения плюрипотентности. Клоны также не экспрессируют B2M. Данные клоны не экспрессируют МНС-I.

На фиг. 16 показаны результаты осуществленного с помощью проточной цитометрии анализа стволовых клеток B2M KO/PD-L1 KI и TXNIP KO/HLA-E KI СуТ49 в отношении их плюрипотентности. Полученные клоны экспрессируют PD-L1 и HLA-E после осуществления дифференцировки до стадии 6 (незрелые бета-клетки). IgG использовали в качестве отрицательного контроля.

На фиг. 17 показаны результаты количественного определения процентного значения экспрессии CHGA, PDX1 и NKX6.1 для клеток на стадии 4 (PEC), дифференцированных из клеток дикого типа, B2M KO, PD-L1 KI/B2M KO (V1A) или TXNIP KO/HLA-E KI (V1B) hESC.

На фиг. 18A, 18B показана экспрессия выбранных генов в зависимости от времени

дифференцировки в клетках TXNIP KO (фиг.18А) или клетках TXNIP KO/HLA-E KI (V1B) (фиг. 18В).

На фиг. 19А, 19В показаны результаты осуществленного с помощью проточной цитометрии анализа на активацию Т-клеток с использованием анализа пролиферации с помощью CFSE. Человеческие первичные CD3+ Т-клетки инкубировали совместно с РЕС, полученным из клонов WT, B2M KO, B2M KO/PD-L1 KI или B2M KO/PD-L1 KI+TXNIP KO/HLA-E KI CyT49 (фиг. 19А). На фиг. 19В представлены сводные данные по активации Т-клеток в различных клетках. Однофакторный ANOVA ( $\alpha=0,05$  с тестом множественных сравнений Даннета) с "CFSE-Т отдельно", взятым в качестве контроля. \*  $p<0,05$ ; \*\*  $p<0,01$ ; \*\*\*  $p<0,001$ ; \*\*\*\*  $p<0,0001$ ; n.s.=статистически незначимый.

На фиг. 20 показана экспрессия выбранных генов в зависимости от времени дифференцировки клеток, дифференцированных из клеток TXNIP KO.

На фиг. 21 показана оценка экспрессии PDX1 и NKX6.1 посредством проточной цитометрии в клетках РЕС, дифференцированных из клеток TXNIP KO.

На фиг. 22 показана морфология различных клонов B2M KO/PD-L1 KI и TXNIP KO/HLA-E KI ("S6-V1B-H9", "S6-V1B-3B11", "S6-V1B-1G7" и "S6-V1B-3C2") по сравнению с клетками дикого типа ("WT") и контрольными клетками с направляющей последовательностью, не обеспечивающей разрезания ("NCG#1"), после дифференцировки до стадии 6.

На фиг. 23А-23F показана экспрессия выбранных генов в клонах после дифференцировки до стадии 6. На фиг. 23А показана экспрессия выбранных генов в зависимости от времени дифференцировки клеток, дифференцированных из иллюстративного клона B2M KO/PD-L1 KI и TXNIP KO/HLA-E KI. На фиг. 23В-23F показана экспрессия генов INS (фиг. 23В), NKX6.1 (фиг. 23С), GCG (фиг. 23D), SST (фиг. 23Е) и GCK (фиг. 23F) в клетках дикого типа ("S6-Cyt49 WT"), контрольных клетках с направляющей последовательностью, не обеспечивающей разрезания ("S6-NCG#1"), и различных клонах B2M KO/PD-L1 KI и TXNIP KO/HLA-E KI ("S6-V1B-H9", "S6-V1B-3B11", "S6-V1B-1G7" и "S6-V1B-3C2"), которые были дифференцированы до стадии 6, с недифференцированным клоном B2M KO/PD-L1 KI и TXNIP KO/HLA-E KI ("ES-V1B-H9") и островками дикого типа ("Островки") в качестве контролей.

На фиг. 24А, 24В показаны результаты осуществленной с помощью проточной цитометрии оценки экспрессии INS и GCG (фиг. 24А) и экспрессии INS и NKX6.1 (фиг. 24В) в клетках на стадии 6, дифференцированных из клона B2M KO/PD-L1 KI и TXNIP KO/HLA-E KI.

На фиг. 25А, 25В показаны процентные значения экспрессии INS (фиг. 25А) и экспрессии NKX6.1 (фиг. 25В) в клетках на стадии 6, дифференцированных из клеток дикого типа ("S6-WT"), контрольных клетках с направляющей последовательностью, не обеспечивающей разрезания ("S6-NCG #1"), и двух клонах B2M KO/PD-L1 KI и TXNIP KO/HLA-E KI ("S6-V1B003" и "V1B-H9").

На фиг. 26А показаны результаты осуществленной с помощью проточной цитометрии оценки экспрессии PDX1 и NKX6.1 в клетках на стадии 4, дифференцированных из клеток клона 1 (B2M KO/PD-L1 KI и TXNIP KO/HLA-E KI) с различной плотностью посева.

На фиг. 26В показаны результаты осуществленной с помощью проточной цитометрии оценки PD-L1 и HLA-E в клетках на стадии 4, дифференцированных из клеток клона 1 (B2M KO/PD-L1 KI и TXNIP KO/HLA-E KI).

На фиг. 27А-27С показаны результаты анализа характеристик посевного клона, дифференцированного до стадии РЕС. На фиг. 27А показана морфология, на фиг. 27В показана экспрессия выбранных генов в зависимости от времени дифференцировки, а на фиг. 27С показан процент клеток, экспрессирующих  $CHGA^+/NKX6.1^+/PDX1^+$ , в дифференцированной популяции.

На фиг. 28 показана экспрессия выбранных генов в зависимости от времени дифференцировки клеток, дифференцированных из клонов TXNIP KO/HLA-E KI.

### Подробное описание

#### I. Определения.

Делеция. Используемый в данном изобретении термин "делеция", который может быть использован взаимозаменяемо с терминами "генетическая делеция" или "нокаут", как правило, относится к генетической модификации, при которой сайт или участок геномной ДНК удаляют посредством любого способа молекулярной биологии, например, посредством способов, описываемых в данном изобретении, например, путем доставки в сайт геномной ДНК эндонуклеазы и по меньшей мере одной gRNA. Может быть удалено любое количество нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления делеция предусматривает удаление по меньшей мере одного, по меньшей мере двух, по меньшей мере трех, по меньшей мере четырех, по меньшей мере пяти, по меньшей мере десяти, по меньшей мере пятнадцати, по меньшей мере двадцати или по меньшей мере 25 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления делеция предусматривает удаление 10-50, 25-75, 50-100, 50-200 или более 100 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления делеция предусматривает удаление всего целевого гена, например гена B2M. В некоторых вариантах осуществления делеция предусматривает удаление части целевого гена, например всего или части промотора и/или кодирующей последовательности гена B2M. В некоторых вариантах осуществления делеция предусматривает удаление регулятора транскрипции, например промоторного участка, целевого гена. В некоторых вариантах осуществления делеция предусматривает удаление всего или части кодирующего участка, в результате чего продукт, обычно экспрессируемый кодирующим

участком, больше не экспрессируется, экспрессируется в усеченной форме или экспрессируется на пониженном уровне. В некоторых вариантах осуществления делеция приводит к снижению экспрессии гена по сравнению с немодифицированной клеткой.

**Эндонуклеаза.** Используемый в данном изобретении термин "эндонуклеаза", как правило, относится к ферменту, который расщепляет фосфодиэфирные связи в полинуклеотиде. В некоторых вариантах осуществления эндонуклеаза специфически расщепляет фосфодиэфирные связи в полинуклеотиде ДНК. В некоторых вариантах осуществления эндонуклеаза представляет собой нуклеазу с "цинковыми пальцами" (ZFN), эффекторную нуклеазу, подобную активатору транскрипции (TALEN), хоминг-эндонуклеазу (HE), мегануклеазу, MegaTAL или CRISPR-ассоциированную эндонуклеазу. В некоторых вариантах осуществления эндонуклеаза представляет собой РНК-направляемую эндонуклеазу. В определенных аспектах РНК-направляемая эндонуклеаза представляет собой CRISPR-нуклеазу, например, CRISPR-эндонуклеазу Cas9 II типа или CRISPR-эндонуклеазу Cpf1 V типа. В некоторых вариантах осуществления эндонуклеаза представляет собой эндонуклеазу Cas1, Cas1B, Cas2, Cas3, Cas4, Cas5, Cas6, Cas7, Cas8, Cas9 (также известную как Csn1 и Csx12), Cas100, Csy1, Csy2, Csy3, Cse1, Cse2, Csc1, Csc2, Csa5, Csn2, Csm2, Csm3, Csm4, Csm5, Csm6, Cmr1, Cmr3, Cmr4, Cmr5, Cmr6, Csb1, Csb2, Csb3, Csx17, Csx14, Csx10, Csx16, CsaX, Csx3, Csx1, Csx15, Csf1, Csf2, Csf3, Csf4 или Cpf1, или ее гомолог, рекомбинантный вариант ее встречающейся в природе молекулы, ее вариант с оптимизированным кодоном или ее модифицированный вариант, или их комбинации. В некоторых вариантах осуществления эндонуклеаза может вводить один или несколько односторонних разрывов (SSB) и/или один или несколько двухсторонних разрывов (DSB).

**Генетическая модификация.** Используемый в данном изобретении термин "генетическая модификация", как правило, относится к сайту геномной ДНК, который был генетически отредактирован или подвергнут манипуляциям с использованием любого молекулярно-биологического способа, например, способов, описываемых в данном изобретении, например, путем доставки в сайт геномной ДНК эндонуклеазы и по меньшей мере одной gRNA. Иллюстративные генетические модификации включают вставки, делеции, дубликации, инверсии и транслокации и их комбинации. В некоторых вариантах осуществления генетической модификацией является делеция. В некоторых вариантах осуществления генетической модификацией является вставка. В других вариантах осуществления генетическая модификация представляет собой мутацию типа "вставка-делеция" (или инсерционно-делеционная мутация), в результате которой рамка считывания целевого гена сдвигается, приводя к получению измененного генного продукта или отсутствию генного продукта.

**Направляющая РНК (gRNA).** Используемый в данном изобретении термин "направляющая РНК" или "gRNA", как правило, относится к короткой рибонуклеиновой кислоте, которая может взаимодействовать, например связываться, с эндонуклеазой и связываться или гибридизироваться с целевым геномным сайтом или целевым участком. В некоторых вариантах осуществления gRNA представляет собой одномолекулярную направляющую РНК (sgRNA). В некоторых вариантах осуществления gRNA может содержать спейсерный участок удлинения. В некоторых вариантах осуществления gRNA может содержать участок удлинения tracrRNA. В некоторых вариантах осуществления gRNA является односторонней. В некоторых вариантах осуществления gRNA содержит встречающиеся в природе нуклеотиды. В некоторых вариантах осуществления gRNA представляет собой химически модифицированную gRNA. В некоторых вариантах осуществления химически модифицированная gRNA представляет собой gRNA, которая содержит по меньшей мере один нуклеотид с химической модификацией, например 2'-О-метил-модификацией сахара. В некоторых вариантах осуществления химически модифицированная gRNA содержит модифицированный каркас нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления химически модифицированная gRNA содержит 2'-О-метил-фосфоротиоатный остаток. В некоторых вариантах осуществления gRNA может быть предварительно составлена в комплекс с ДНК-эндонуклеазой.

**Вставка.** Используемый в данном изобретении термин "вставка", который может быть использован взаимозаменяемо с терминами "генетическая вставка" или "нокин", как правило, относится к генетической модификации, при которой полинуклеотид вводят или добавляют в сайт или участок геномной ДНК посредством любого молекулярно-биологического способа, например, посредством способов, описываемых в данном изобретении, например, путем доставки в сайт геномной ДНК эндонуклеазы и по меньшей мере одной gRNA. В некоторых вариантах осуществления вставку можно осуществлять в пределах сайта геномной ДНК или рядом с ним, который являлся сайтом для предыдущей генетической модификации, например, делеции или мутации типа "вставка-делеция". В некоторых вариантах осуществления вставку осуществляют по сайту геномной ДНК, которая частично перекрывается, полностью перекрывается или содержится в сайте предварительной генетической модификации, например, делеции или мутации типа "вставка-делеция". В некоторых вариантах осуществления вставку осуществляют в локус типа "safe harbor". В некоторых вариантах осуществления вставка предусматривает введение полинуклеотида, который кодирует представляющий интерес белок. В некоторых вариантах осуществления вставка предусматривает введение полинуклеотида, который кодирует толерогенный фактор. В некоторых вариантах осуществления вставка предусматривает

введение полинуклеотида, который кодирует фактор выживания. В некоторых вариантах осуществления вставка предусматривает введение экзогенного промотора, например, конститутивного промотора, например, промотора СAG. В некоторых вариантах осуществления вставка предусматривает введение полинуклеотида, который кодирует некодирующий ген. Обычно полинуклеотид, подлежащий вставке, фланкирован последовательностями (например, плечами гомологии), характеризующимися значительной гомологией последовательностей с геномной ДНК в сайте вставки или рядом с ним.

Главный комплекс гистосовместимости класса I (МНС-I). Используемые в данном изобретении термины "главный комплекс гистосовместимости класса I" или "МНС-I", как правило, относятся к классу биологических молекул, которые расположены на клеточной поверхности всех ядродержащих клеток у позвоночных, в том числе млекопитающих, например людей; и функционируют с представлением пептидов не являющихся своими или чужеродных антигенов, например белков, из клетки (т.е. цитозоля) цитотоксическим Т-клеткам, например CD8+ Т-клеткам, для стимуляции иммунного ответа. В некоторых вариантах осуществления биологическая молекула МНС-I представляет собой ген МНС-I или белок МНС-I. Образование комплекса белков МНС-I с белком бета-2-микроглобулином (В2М) необходимо для экспрессии на клеточной поверхности всех белков МНС-I. В некоторых вариантах осуществления снижение экспрессии человеческого лейкоцитарного антигена (HLA) МНС-I по сравнению с немодифицированной клеткой предусматривает снижение (или уменьшение) экспрессии гена МНС-I. В некоторых вариантах осуществления снижение экспрессии человеческого лейкоцитарного антигена (HLA) МНС-I по сравнению с немодифицированной клеткой предусматривает снижение (или уменьшение) экспрессии на клеточной поверхности белка МНС-I. В некоторых вариантах осуществления биологическая молекула МНС-I представляет собой HLA-A (NCBI Gene ID No: 3105), HLA-B (NCBI Gene ID No: 3106), HLA-C (NCBI Gene ID No: 3107) или В2М (NCBI Gene ID No: 567).

Главный комплекс гистосовместимости класса II (МНС-II). Используемые в данном изобретении термины "главный комплекс гистосовместимости класса II" или "МНС-II", как правило, относятся к классу биологических молекул, которые обычно находятся на клеточной поверхности антигенпрезентирующих клеток у позвоночных, в том числе млекопитающих, например, людей, и они осуществляют свою функцию с представлением пептидов не являющихся своими или чужеродных антигенов, например, белков, вне клетки (внеклеточно) цитотоксическим Т-клеткам, например CD8+ Т-клеткам, для стимуляции иммунного ответа. В некоторых вариантах осуществления антигенпрезентирующая клетка представляет собой дендритную клетку, макрофаг или В-клетку. В некоторых вариантах осуществления биологическая молекула МНС-II представляет собой ген МНС-II или белок МНС-II. В некоторых вариантах осуществления снижение экспрессии человеческого лейкоцитарного антигена (HLA) МНС-II по сравнению с немодифицированной клеткой предусматривает снижение (или уменьшение) экспрессии гена МНС-II. В некоторых вариантах осуществления снижение экспрессии человеческого лейкоцитарного антигена (HLA) МНС-II по сравнению с немодифицированной клеткой предусматривает снижение (или уменьшение) экспрессии на клеточной поверхности белка МНС-II. В некоторых вариантах осуществления биологическая молекула МНС-II представляет собой HLA-DPA (NCBI Gene ID No: 3113), HLA-DPB (NCBI Gene ID No: 3115), HLA-DMA (NCBI Gene ID No: 3108), HLA-DMB (NCBI Gene ID No: 3109), HLA-DOA (NCBI Gene ID No: 3111), HLA-DOB (NCBI Gene ID No: 3112), HLA-DQA (NCBI Gene ID No: 3117), HLA-DQB (NCBI Gene ID No: 3119), HLA-DRA (NCBI Gene ID No: 3122) или HLA-DRB (NCBI Gene ID No: 3123).

Полинуклеотид. Используемый в данном изобретении термин "полинуклеотид", который может быть использован взаимозаменяемо с термином "нуклеиновая кислота", как правило, относится к биологической молекуле, которая содержит два или более нуклеотида. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид содержит по меньшей мере два, по меньшей мере пять, по меньшей мере десять, по меньшей мере двадцать, по меньшей мере 30, по меньшей мере 40, по меньшей мере 50, по меньшей мере 100, по меньшей мере 200, по меньшей мере 250, по меньшей мере 500 или любое количество нуклеотидов. Например, полинуклеотиды могут содержать по меньшей мере 500 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно 600 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно 700 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно 800 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно 900 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно 1000 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно 2000 нуклеотидов, по меньшей мере примерно приблизительно 3000 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно 4000 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно 4500 нуклеотидов или по меньшей мере приблизительно 5000 нуклеотидов. Полинуклеотид может представлять собой молекулу ДНК или РНК или гибридную молекулу ДНК/РНК. Полинуклеотид может быть одонитевым или двухнитевым. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид является сайтом или участком геномной ДНК. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид представляет собой эндогенный ген, который содержится в геноме немодифицированной клетки или универсальной донорской клетки. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид является экзогенным полинуклеотидом, который не интегрирован в геномную ДНК. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид является экзогенным полинуклеотидом, который интегрирован в геномную ДНК. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид представляет собой плазмиду или вектор на основе аденоассоциированного вируса. В

некоторых вариантах осуществления полинуклеотид является кольцевой или линейной молекулой.

Локус типа "safe harbor". Используемый в данном изобретении термин локус типа "safe harbor", как правило, относится к любому местоположению, сайту или участку геномной ДНК, которые в состоянии обеспечить генетическую вставку в указанные местоположение, сайт или участок без неблагоприятных воздействий на клетку. В некоторых вариантах осуществления локус типа "safe harbor" представляет собой внутригенный или экстрагенный участок. В некоторых вариантах осуществления локус типа "safe harbor" представляет собой участок геномной ДНК, которая, как правило, транскрипционно неактивна. В некоторых вариантах осуществления локус типа "safe harbor" представляет собой локус AAVS1 (PPP1R12C), ALB, Angptl3, ApoC3, ASGR2, CCR5, FIX (F9), G6PC, Gys2, HGD, Lp(a), Pcsk9, Serpina1, TF или TTR. В некоторых вариантах осуществления локус типа "safe harbor" описан у Sadelain, M. et al., "Safe harbours for the integration of new ДНК in the human genome", Nature Reviews Cancer, 2012, vol. 12, p. 51-58.

Переключатель безопасности. Используемый в данном изобретении термин "переключатель безопасности", как правило, относится к биологической молекуле, которая приводит клетку к апоптозу. В некоторых вариантах осуществления переключатель безопасности представляет собой белок или ген. В некоторых вариантах осуществления переключатель безопасности представляет собой суицидальный ген. В некоторых вариантах осуществления переключатель безопасности, например тимидинкиназа вируса простого герпеса (HSV-tk), приводит клетку к апоптозу за счет метаболизма пролекарства, например ганцикловира. В некоторых вариантах осуществления сверхэкспрессированное присутствие переключателя безопасности само по себе приводит клетку к апоптозу. В некоторых вариантах осуществления переключатель безопасности представляет собой молекулу на основе p53, HSV-tk или индуцируемую каспазу-9.

Субъект. Используемый в данном изобретении термин "субъект" относится к млекопитающему. В некоторых вариантах осуществления субъектом является отличный от человека примат или грызун. В некоторых вариантах осуществления субъектом является человек. В некоторых вариантах осуществления у субъекта имеется заболевание или нарушение, есть подозрение на их наличие или риск их возникновения. В некоторых вариантах осуществления у субъекта имеется один или несколько симптомов заболевания или нарушения.

Фактор выживания. Используемый в данном изобретении термин "фактор выживания", как правило, относится к белку (например, экспрессируемому полинуклеотидом, описываемым в данном изобретении), который при увеличении или уменьшении в клетке позволяет клетке, например универсальной донорской клетке, выживать после трансплантации или приживления у субъекта-хозяина при более высоких показателях выживаемости по сравнению с немодифицированной клеткой. В некоторых вариантах осуществления фактор выживания представляет собой человеческий фактор выживания. В некоторых вариантах осуществления фактор выживания является представителем критического сигнального пути, вовлеченного в выживаемость клетки. В некоторых вариантах осуществления критический сигнальный путь, вовлеченный в выживаемость клетки, влияет на гипоксию, активные формы кислорода, истощение питательных веществ и/или оксидативный стресс. В некоторых вариантах осуществления генетическая модификация, например делеция или вставка, по меньшей мере одного фактора выживания обеспечивает выживание универсальной донорской клетки на протяжении более длительного периода времени, например, на протяжении периода времени, который в по меньшей мере 1,05, по меньшей мере 1,1, по меньшей мере 1,25, по меньшей мере 1,5, по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 10, по меньшей мере 20 или по меньшей мере 50 раз превышает такой период времени у немодифицированной клетки после приживления трансплантата. В некоторых вариантах осуществления фактор выживания представляет собой ZNF143 (NCBI Gene ID No: 7702), TXNIP (NCBI Gene ID No: 10628), FOXO1 (NCBI Gene ID No: 2308), JNK (NCBI Gene ID No: 5599) или MANF (NCBI Gene ID No: 7873). В некоторых вариантах осуществления фактор выживания вставляют в клетку, например универсальную донорскую клетку. В некоторых вариантах осуществления фактор выживания удаляют из клетки, например универсальной донорской клетки. В некоторых вариантах осуществления вставка полинуклеотида, который кодирует MANF, позволяет клетке, например универсальной донорской клетке, выживать после трансплантации субъекту-реципиенту или приживления трансплантата в субъекте-реципиенте при более высоких показателях выживаемости по сравнению с немодифицированной клеткой. В некоторых вариантах осуществления делеция или мутация типа "вставка-делеция" в пределах гена ZNF143, TXNIP, FOXO1 или JNK или рядом с ним позволяет клетке, например универсальной донорской клетке, выживать после трансплантации субъекту-реципиенту или приживления трансплантата в субъекте-хозяине при более высоких показателях выживаемости по сравнению с немодифицированной клеткой.

Толерогенный фактор. Используемый в данном изобретении термин "толерогенный фактор", как правило, относится к белку (например, экспрессируемому полинуклеотидом, описываемым в данном изобретении), который при увеличении или уменьшении в клетке позволяет клетке, например универсальной донорской клетке, подавлять иммунное отторжение или ускользать от иммунного отторжения после трансплантации субъекту-реципиенту или приживления трансплантата у субъекта-реципиента при более высоких коэффициентах по сравнению с немодифицированной клеткой. В

некоторых вариантах осуществления толерогенный фактор представляет собой человеческий толерогенный фактор. В некоторых вариантах осуществления генетическая модификация по меньшей мере одного толерогенного фактора (например, вставка или делеция по меньшей мере одного толерогенного фактора) позволяет клетке, например универсальной донорской клетке, подавлять иммунное отторжение или ускользать от иммунного отторжения с коэффициентами, которые в по меньшей мере 1,05, по меньшей мере 1,1, по меньшей мере 1,25, по меньшей мере 1,5, по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 10, по меньшей мере 20 или по меньшей мере 50 раз превышают такие коэффициенты у немодифицированной клетки после приживления трансплантата. В некоторых вариантах осуществления толерогенный фактор представляет собой HLA-E (NCBI Gene ID No: 3133), HLA-G (NCBI Gene ID No: 3135), CTLA-4 (NCBI Gene ID No: 1493), CD47 (NCBI Gene ID No: 961) или PD-L1 (NCBI Gene ID No: 29126). В некоторых вариантах осуществления толерогенный фактор вставляют в клетку, например универсальную донорскую клетку. В некоторых вариантах осуществления толерогенный фактор удаляют из клетки, например универсальной донорской клетки. В некоторых вариантах осуществления вставка полинуклеотида, который кодирует HLA-E, HLA-G, CTLA-4, CD47 и/или PD-L1, позволяет клетке, например универсальной донорской клетке, подавлять иммунное отторжение или ускользать от иммунного отторжения после трансплантации субъекту-реципиенту или приживления трансплантата у субъекта-реципиента.

Регулятор транскрипции МНС-I или МНС-II. Используемый в данном изобретении термин "регулятор транскрипции МНС-I или МНС-II", как правило, относится к биологической молекуле, которая модулирует, например повышает или снижает, экспрессию человеческого лейкоцитарного антигена МНС-I и/или МНС-II. В некоторых вариантах осуществления биологическая молекула представляет собой полинуклеотид, например ген или белок. В некоторых вариантах осуществления регулятор транскрипции МНС-I или МНС-II будет повышать или снижать экспрессию на клеточной поверхности по меньшей мере одного белка МНС-I или МНС-II. В некоторых вариантах осуществления регулятор транскрипции МНС-I или МНС-II будет повышать или снижать экспрессию по меньшей мере одного гена МНС-I или МНС-II. В некоторых вариантах осуществления регулятор транскрипции представляет собой СИТА (NCBI Gene ID No: 4261) или NLRC5 (NCBI Gene ID No: 84166). В некоторых вариантах осуществления делеция или уменьшение экспрессии СИТА или NLRC5 обеспечивает снижение экспрессии по меньшей мере одного гена МНС-I или МНС-II.

Универсальная донорская клетка. Используемый в данном изобретении термин "универсальная донорская клетка", как правило, относится к генетически модифицированной клетке, которая менее восприимчива к аллогенному отторжению в ходе клеточной трансплантации и/или демонстрирует повышенную выживаемость после трансплантации по сравнению с немодифицированной клеткой. В некоторых вариантах осуществления генетически модифицированная клетка, описываемая в данном изобретении, является универсальной донорской клеткой. В некоторых вариантах осуществления универсальная донорская клетка характеризуется повышенной способностью к ускользанию от иммунного надзора и/или повышенной выживаемостью клетки по сравнению с немодифицированной клеткой. В некоторых вариантах осуществления универсальная донорская клетка характеризуется повышенной выживаемостью клетки по сравнению с немодифицированной клеткой. В некоторых вариантах осуществления универсальная донорская клетка может быть стволовой клеткой. В некоторых вариантах осуществления универсальная донорская клетка может представлять собой эмбриональную стволовую клетку (ESC), стволовую клетку взрослого организма (ASC), индуцированную плюрипотентную стволовую клетку (iPSC) или гемопоэтическую стволовую клетку и клетку-предшественника (HSPC) (также называемую гемопоэтической стволовой клеткой (HSC)). В некоторых вариантах осуществления универсальная донорская клетка может быть дифференцированной клеткой. В некоторых вариантах осуществления универсальная донорская клетка может быть соматической клеткой (например, клетками иммунной системы). В некоторых вариантах осуществления универсальную донорскую клетку вводят субъекту. В некоторых вариантах осуществления универсальную донорскую клетку вводят субъекту, у которого имеется заболевание, есть подозрение на его наличие или риск его возникновения. В некоторых вариантах осуществления универсальная донорская клетка способна дифференцироваться в линиеспецифические клетки-предшественники или полностью дифференцированные соматические клетки. В некоторых вариантах осуществления линиеспецифические клетки-предшественники представляют собой предшественники энтодермальной части поджелудочной железы, предшественники эндокринной части поджелудочной железы, мезенхимальные клетки-предшественники, мышечные клетки-предшественники, бластные клетки, гемопоэтические клетки-предшественники или нервные клетки-предшественники. В некоторых вариантах осуществления полностью дифференцированные соматические клетки представляют собой эндокринные секреторные клетки, такие как бета-клетки поджелудочной железы, эпителиальные клетки, энтодермальные клетки, макрофаги, гепатоциты, адипоциты, клетки почки, клетки крови или клетки иммунной системы. В некоторых вариантах осуществления полностью дифференцированные соматические клетки представляют собой кардиомиоциты.

Немодифицированная клетка. Используемый в данном изобретении термин "немодифицированная

клетка" относится к клетке, которую не подвергали генетической модификации с вовлечением полинуклеотида или гена, который кодирует МНС-I, МНС-II, регулятор транскрипции МНС-I или МНС-II, фактор выживания и/или толерогенный фактор. В некоторых вариантах осуществления немодифицированная клетка может быть стволовой клеткой. В некоторых вариантах осуществления немодифицированная клетка может представлять собой эмбриональную стволовую клетку (ESC), стволовую клетку взрослого организма (ASC), индуцированную плюрипотентную стволовую клетку (iPSC) или гемопоэтическую стволовую клетку или клетку-предшественника (HSPC) (также называемую гемопоэтической стволовой клеткой (HSC)). В некоторых вариантах осуществления немодифицированная клетка может быть дифференцированной клеткой. В некоторых вариантах осуществления немодифицированная клетка может быть выбрана из соматических клеток (например, клеток иммунной системы, например, Т-клетка, например, CD8+ Т-клетка). Если универсальную донорскую клетку "сравнивают с немодифицированной клеткой", то универсальная донорская клетка и немодифицированная клетка принадлежат к одному и тому же типу клеток или имеют общую родительскую линию клеток, например, универсальную донорскую iPSC сравнивают с немодифицированной iPSC.

В пределах гена или рядом с ним. Используемый в данном изобретении термин "в пределах гена или рядом с ним" относится к сайту или участку геномной ДНК, которые являются интронным или экстронным компонентом указанного гена или располагаются проксимально по отношению к указанному гену. В некоторых вариантах осуществления сайт геномной ДНК находится внутри гена, если он содержит по меньшей мере часть интрона или экзона указанного гена. В некоторых вариантах осуществления сайт геномной ДНК, расположенный рядом с геном, может находиться на 5'- или 3'-конце указанного гена (например, на 5'- или 3'-конце кодирующего участка указанного гена). В некоторых вариантах осуществления сайт геномной ДНК, расположенный рядом с геном, может быть промоторным участком или репрессорным участком, который модулирует экспрессию указанного гена. В некоторых вариантах осуществления сайт геномной ДНК, расположенный рядом с геном, может находиться на той же хромосоме, что и указанный ген. В некоторых вариантах осуществления сайт или участок геномной ДНК находится рядом с геном, если он находится в пределах 50 т.п. о., 40 т.п. о., 30 т.п. о., 20 т.п. о., 10 т.п. о., 5 т.п. о., 1 т.п. о. или ближе к 5'- или 3'-концу указанного гена (например, к 5'- или 3'-концу кодирующего участка указанного гена).

## II. Способ редактирования генома.

Редактирование генома в целом относится к процессу модификации нуклеотидной последовательности генома, предпочтительно точным или заранее определенным образом. В некоторых вариантах осуществления способы редактирования генома, описываемые в данном изобретении, например система CRISPR-эндонуклеаза, могут быть использованы для генетической модификации клетки, как описывается в данном изобретении, например, для создания универсальной донорской клетки. В некоторых вариантах осуществления способы редактирования генома, описываемые в данном изобретении, например система CRISPR-эндонуклеаза, могут быть использованы для генетической модификации клетки, как описывается в данном изобретении, например для введения по меньшей мере одной генетической модификации в пределах по меньшей мере одного гена или рядом с ним, которая снижает экспрессию одного или нескольких человеческих лейкоцитарных антигенов МНС-I и/или МНС-II или других компонентов комплекса МНС-I или МНС-II по сравнению с немодифицированной клеткой; для введения по меньшей мере одной генетической модификации, которая повышает экспрессию по меньшей мере одного полинуклеотида, который кодирует толерогенный фактор, по сравнению с немодифицированной клеткой; и/или для введения по меньшей мере одной генетической модификации, которая повышает или снижает экспрессию по меньшей мере одного гена, который кодирует фактор выживания, по сравнению с немодифицированной клеткой.

Примеры способов редактирования генома, описанных в данном изобретении, включают способы применения сайт-направленных нуклеаз для разрезания дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) в точных целевых местоположениях в геноме с созданием таким образом однонитевых или двухнитевых разрывов ДНК в конкретных местоположениях в геноме. Такие разрывы могут подвергаться репарации и регулярно подвергаются ей за счет естественных эндогенных клеточных процессов, таких как гомологичная репарация (HDR) и негомологичное соединение концов (NHEJ), как описано в Cox et al., "Therapeutic genome editing: prospects and challenges", *Nature Medicine*, 2015, 21(2), 121-31. Эти два основных процесса репарации ДНК состоят из семейства альтернативных путей. При NHEJ происходит непосредственное соединение концов ДНК, образовавшихся в результате двухнитевого разрыва, иногда с потерей или добавлением нуклеотидной последовательности, которая может нарушать или усиливать экспрессию гена. При HDR гомологичная последовательность или донорская последовательность используется в качестве матрицы для вставки определенной последовательности ДНК в точке разрыва. Гомологичная последовательность может быть эндогенной в геноме, например сестринской хроматидой. В качестве альтернативы донорская последовательность может представлять собой экзогенный полинуклеотид, такой как плазмида, однонитевой олигонуклеотид, двухнитевой олигонуклеотид, дуплексный олигонуклеотид или вирус, который содержит участки (например, левое и правое плечи

гомологии) высокой степени гомологии с расщепляемым нуклеазой локусом, но который также может содержать дополнительную последовательность или изменения последовательности, включая делеции, которые могут быть встроены в расщепляемый целевой локус. Третий механизм репарации может представлять собой микрогомологичное соединение концов (ММЕЈ), также называемое "альтернативным NHEJ", при котором генетический результат аналогичен NHEJ в том смысле, что в сайте расщепления могут иметь место небольшие делеции и вставки. При ММЕЈ могут использоваться гомологичные последовательности из нескольких пар оснований, фланкирующих сайт разрыва ДНК, для достижения более благоприятного результата репарации с соединением концов ДНК, и в недавних отчетах дополнительно прояснен молекулярный механизм данного процесса; см., например, Cho and Greenberg, *Nature*, 2015, 518, 174-76; Kent et al., *Nature Structural and Molecular Biology*, 2015, 22(3):230-7; Mateos-Gomez et al., *Nature*, 2015, 518, 254-57; Ceccaldi et al., *Nature*, 2015, 528, 258-62. В некоторых случаях может быть возможным предсказывать вероятные результаты репарации с учетом анализа потенциальных микрогомологий в сайте разрыва ДНК.

Каждый из этих механизмов редактирования генома можно применять для создания необходимых генетических модификаций. Одной из стадий в процессе редактирования генома может быть создание одного или двух разрывов ДНК, в последнем случае в виде двухнитевых разрывов или двух одонитевых разрывов, в целевом локусе как можно ближе к сайту предполагаемой мутации. Этого можно достигнуть посредством применения эндонуклеаз, как описано и проиллюстрировано в данном изобретении.

Система CRISPR-эндонуклеаза.

Система CRISPR-эндонуклеаза представляет собой встречающийся в природе защитный механизм у прокариот, который был переориентирован в РНК-направляемую платформу для нацеливания на ДНК, используемую для редактирования генов. Системы CRISPR включают системы I, II, III, IV, V и VI типов. В некоторых аспектах система CRISPR представляет собой систему CRISPR/Cas9 II типа. В других аспектах система CRISPR представляет собой систему CRISPR/Cpf1 V типа. Системы CRISPR основаны на ДНК-эндонуклеазе, например Cas9, и двух некодирующих РНК - crRNA (crRNA) и транскрибирующей РНК (tracrRNA) - для нацеливания на расщепление ДНК.

crRNA управляет распознаванием последовательности и специфичностью комплекса CRISPR-эндонуклеаза посредством спаривания оснований по Уотсону-Крику, как правило с 20-нуклеотидной (нт) последовательностью в целевой ДНК. Изменение последовательности из 20 нт на 5'-конце в crRNA позволяет нацеливать комплекс CRISPR-эндонуклеаза на конкретные локусы. Комплекс CRISPR-эндонуклеаза связывает только последовательности ДНК, которые содержат последовательность, соответствующую первым 20 нт одиночной направляющей РНК (sgRNA), если после целевой последовательности следует определенный короткий мотив ДНК (с последовательностью NGG), называемый мотивом, прилегающим к протоспейсеру (PAM).

TracrRNA гибридизируется с 3'-концом crRNA с образованием структуры РНК-дуплекса, которая связывается эндонуклеазой с образованием каталитически активного комплекса CRISPR-эндонуклеаза, который затем может расщеплять целевую ДНК.

Как только комплекс CRISPR-эндонуклеаза связывается с ДНК в целевом сайте, каждый из двух независимых нуклеазных доменов в эндонуклеазе расщепляет одну из нитей ДНК на три основания выше сайта PAM, оставляя двухнитевый разрыв (DSB), при этом обе нити ДНК заканчиваются парой оснований (тупым концом).

В некоторых вариантах осуществления эндонуклеаза представляет собой Cas9 (CRISPR-ассоциированный белок 9). В некоторых вариантах осуществления эндонуклеаза Cas9 получена из *Streptococcus pyogenes*, хотя могут использоваться другие гомологи Cas9, например Cas9 *S. aureus*, Cas9 *N. meningitidis*, CRISPR 1-Cas9 *S. thermophilus*, CRISPR 3-Cas9 *S. Thermophilus* или Cas9 *T. denticola*. В других случаях CRISPR-эндонуклеаза представляет собой Cpf1, например, ND2006 Cpf1 *L. bacterium* или BV3L6 Cpf1 *Acidaminococcus* sp. В некоторых вариантах осуществления эндонуклеаза представляет собой эндонуклеазу Cas1, Cas1B, Cas2, Cas3, Cas4, Cas5, Cas6, Cas7, Cas8, Cas9 (также известную как Csn1 и Csx12), Cas100, Csy1, Csy2, Csy3, Cse1, Cse2, Csc1, Csc2, Csa5, Csn2, Csm2, Csm3, Csm4, Csm5, Csm6, Cmr1, Cmr3, Cmr4, Cmr5, Cmr6, Csb1, Csb2, Csb3, Csx17, Csx14, Csx10, Csx16, CsaX, Csx3, Csx1, Csx15, Csf1, Csf2, Csf3, Csf4 или Cpf1. В некоторых вариантах осуществления могут быть использованы варианты дикого типа. В некоторых вариантах осуществления могут быть использованы модифицированные варианты (например, ее гомолог, рекомбинантный вариант ее встречающейся в природе молекулы, ее кодон-оптимизированные или модифицированные варианты) указанных выше эндонуклеаз.

CRISPR-нуклеаза может быть связана с по меньшей мере одним сигналом ядерной локализации (NLS). По меньшей мере один NLS может располагаться на аминоконце или в пределах 50 аминокислот от аминоконца CRISPR-нуклеазы и/или по меньшей мере один NLS может располагаться на аминоконце или в пределах 50 аминокислот от карбоксиконца CRISPR-нуклеазы.

Иллюстративные полипептиды CRISPR/Cas включают полипептиды Cas9, описанные у Fonfara et al., "Phylogeny of Cas9 determines functional exchangeability of dual-RNA and Cas9 among orthologous type II CRISPR-Cas systems", *Nucleic Acids Research*, 2014, 42:2577-2590. С тех пор как были открыты гены Cas,

система наименования генов CRISPR/Cas претерпела значительные изменения. В публикации Fonfara et al. также представлены последовательности PAM для полипептидов Cas9 от различных видов.

Нуклеазы с "цинковыми пальцами".

Нуклеазы с "цинковыми пальцами" (ZFN) представляют собой модульные белки, состоящие из сконструированного ДНК-связывающего домена "цинковый палец", связанного с каталитическим доменом эндонуклеазы FokI типа II. Поскольку FokI функционирует только в форме димера, необходимо сконструировать пару ZFN для связывания с когнатными последовательностями целевых "полусайтов" на противоположных нитях ДНК с точным расстоянием между ними для обеспечения образования каталитически активного димера FokI. После димеризации домена FokI, который сам по себе не обладает специфичностью к последовательности, между полусайтами для ZFN образуется двухнитевой разрыв ДНК в качестве стадии иницирования редактирования генома.

ДНК-связывающий домен каждой ZFN обычно состоит из 3-6 "цинковых пальцев" широко распространенной архитектуры Cys2-His2, причем каждый "палец" в основном распознает триплет нуклеотидов на одной нити последовательности целевой ДНК, хотя перекрестное взаимодействие с четвертым нуклеотидом на другой нити также может быть важным. Изменение аминокислот "пальца" в положениях, в которых устанавливаются ключевые контакты с ДНК, изменяет специфичность данного "пальца" к последовательности. Таким образом, белок с четырьмя "цинковыми пальцами" будет селективно распознавать целевую последовательность длиной 12 п. о., где целевая последовательность представляет собой совокупность предпочитаемых триплетов, представленных для каждого "пальца", хотя на предпочтение триплета могут в различной степени оказывать влияние соседние "пальцы". Важным аспектом ZFN является то, что их можно легко перенацелить практически на любой адресный участок генома, просто модифицируя отдельные "пальцы". В большинстве вариантов применения ZFN используются белки с 4-6 "пальцами", соответственно распознающие 12-18 п. о. Таким образом, пара ZFN обычно распознает комбинированную целевую последовательность длиной 24-36 п. о., не включающую типичный спейсер длиной 5-7 п. о. между полусайтами. Сайты связывания могут быть дополнительно разделены более крупными спейсерами, в том числе спейсерами длиной 15-17 п. о. Целевая последовательность такой длины, вероятно, будет уникальной в геноме человека при предположении, что повторяющиеся последовательности или гомологи генов исключаются в процессе разработки. Тем не менее, ДНК-белковые взаимодействия ZFN не являются абсолютными по своей специфичности, поэтому события нецелевого связывания и расщепления все же происходят, будь то в случае с гетеродимером двух ZFN или в случае с гомодимером одной или другой ZFN. Последняя возможность была эффективно устранена путем конструирования интерфейса димеризации домена FokI для создания вариантов "плюс" и "минус", также известных как облигатно-гетеродимеризующиеся варианты, которые могут димеризоваться только друг с другом, но не друг с другом. Принудительное образование облигатного гетеродимера предотвращает образование гомодимера. Это значительно повысило специфичность ZFN, а также любых других нуклеаз, которые имеют в своем составе эти варианты FokI.

В уровне техники было описано множество систем на основе ZFN, об их модификациях регулярно сообщается, и в многочисленных литературных источниках описываются правила и параметры, которые используются для руководства разработкой ZFN; см., например, Segal et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 1999, 96(6):2758-63; Dreier B. et al., J. Mol. Biol., 2000, 303(4):489-502; Liu Q et al., J. Biol. Chem., 2002, 277(6):3850-6; Dreier et al., J. Biol. Chem., 2005, 280(42):35588-97; и Dreier et al., J. Biol. Chem., 2001, 276(31):29466-78.

Эффекторные нуклеазы, подобные активаторам транскрипции (TALEN).

TALEN представляют собой другой формат модульных нуклеаз, в которых, как и в случае с ZFN, сконструированный ДНК-связывающий домен связан с доменом нуклеазы FokI, и пара TALEN функционирует совместно для достижения нацеленного расщепления ДНК. Основное отличие от ZFN заключается в природе ДНК-связывающего домена и связанных с ней свойств распознавания последовательности целевой ДНК. ДНК-связывающий домен TALEN происходит из белков TALE, которые первоначально были описаны у бактериального патогена растений *Xanthomonas* sp. TALE состоят из тандемных массивов из 33-35 аминокислотных повторов, при этом каждый повтор распознает одну пару оснований в последовательности целевой ДНК, длина которой обычно составляет до 20 п. о., что дает общую длину целевой последовательности до 40 п. о. Нуклеотидная специфичность каждого повтора определяется парой повторяющихся переменных остатков (RVD), которая включает только две аминокислоты в положениях 12 и 13. Основания гуанин, аденин, цитозин и тимин преимущественно распознаются четырьмя RVD: Asn-Asn, Asn-Ile, His-Asp и Asn-Gly соответственно. Этот код распознавания является намного более простым, чем код "цинковых пальцев", и, таким образом, имеет преимущество перед последним при разработке нуклеазы. Тем не менее, как и в случае с ZFN, ДНК-белковые взаимодействия TALEN не являются абсолютными по своей специфичности, и в случае с TALEN также извлекались преимущества из использования облигатно-гетеродимеризующихся вариантов домена FokI для снижения нецелевой активности.

Были созданы дополнительные варианты домена FokI, у которых инактивирована их

каталитическая функция. Если одна половина пары TALEN или ZFN содержит неактивный домен FokI, то в целевом сайте будет происходить только одностороннее расщепление (нирование) ДНК, а не DSB. Результат сопоставим с применением "никазных" мутантных форм CRISPR/Cas9 или CRISPR/Cpf1, у которых один из расщепляющих доменов Cas9 был инактивирован. Односторонние разрывы ДНК можно использовать для контроля редактирования генома с помощью HDR, но с меньшей эффективностью, чем в случае DSB. Основное преимущество заключается в том, что нецелевые односторонние разрывы быстро и точно репарируются, в отличие от DSB, которые подвержены неправильной репарации, опосредованной NHEJ.

В уровне техники было описано множество систем на основе TALEN, и об их модификациях регулярно сообщается; см., например, Boch, *Science*, 2009, 326(5959):1509-12; Mak et al., *Science*, 2012, 335(6069):716-9; и Moscou et al., *Science*, 2009, 326(5959):1501. Применение TALEN на основе платформы "Golden Gate" или схемы клонирования было описано многими группами; см., например, Cermak et al., *Nucleic Acids Res.*, 2011, 39(12):e82; Li et al., *Nucleic Acids Res.*, 2011, 39(14):6315-25; Weber et al., *PLoS One.*, 2011, 6(2):e16765; Wang et al., *J. Genet. Genomics.*, 2014, 41(6):339-47; и Cermak T. et al., *Methods Mol. Biol.*, 2015, 1239:133-59.

Хоминг-эндонуклеазы.

Хоминг-эндонуклеазы (HE) представляют собой специфичные в отношении последовательности эндонуклеазы, которые имеют длинные распознающие последовательности (14-44 пары оснований) и расщепляют ДНК с высокой специфичностью - часто в уникальных сайтах в геноме. Существует по меньшей мере шесть известных семейств HE, классифицируемых по их структуре, в том числе GIY-YIG, бокс His-Cis, H-N-H, PD-(D/E)xK и Vsr-подобные, которые происходят из обширного ряда хозяев, включающих эукариоты, простейшие, бактерии, археи, цианобактерии и фаг. Как и в случае с ZFN и TALEN, HE можно применять для создания DSB в целевом локусе в качестве начальной стадии редактирования генома. Кроме того, некоторые естественные и сконструированные HE разрезают только одну нить ДНК, функционируя таким образом как сайт-специфические никазы. Большой размер целевой последовательности для HE и специфичность, которой они обладают, сделали их привлекательными кандидатами для создания сайт-специфических DSB.

В уровне техники было описано множество систем на основе HE, и об их модификациях регулярно сообщается; см., например, обзоры Steentoft et al., *Glycobiology*, 2014, 24(8):663-80; Belfort and Bonocora, *Methods Mol. Biol.*, 2014, 1123:1-26; и Hafez and Hausner, *Genome*, 2012, 55(8):553-69.

MegaTAL/Tev-mTALEN/MegaTev.

В платформе MegaTAL и платформе Tev-mTALEN в качестве дополнительных примеров гибридных нуклеаз используют слияние ДНК-связывающих доменов TALE и каталитически активных HE, извлекая преимущества как из настраиваемого связывания ДНК, так и из специфичности TALE, а также специфичности расщепляющей последовательности HE; см., например, Boissel et al., *Nucleic Acids Res.*, 2014, 42:2591-2601; Kleinstiver et al., *G3*, 2014, 4:1155-65; и Boissel and Scharenberg, *Methods Mol. Biol.*, 2015, 1239:171-96.

В дополнительном варианте архитектура MegaTev представляет собой слияние мегануклеазы (Mega) с нуклеазным доменом, полученным из хоминг-эндонуклеазы GIY-YIG I-TevI (Tev). Два активных сайта располагаются на расстоянии ~30 п. о. на ДНК-субстрате и образуют два DSB с несовместимыми липкими концами; см., например, Wolfs et al., *Nucleic Acids Res.*, 2014, 42, 8816-29. Предполагается, что будут разрабатываться другие комбинации существующих подходов, основанных на использовании нуклеаз, и они будут полезны для осуществления направленных модификаций генома, описанных в данном изобретении.

dCas9-FokI или dCpf1-FokI и другие нуклеазы.

Объединение структурных и функциональных свойств нуклеазных платформ, описанных выше, предлагает дополнительный подход к редактированию генома, который потенциально может преодолеть некоторые из присущих им недостатков. Например, в системе редактирования генома CRISPR обычно используется одна эндонуклеаза Cas9 для создания DSB. Специфичность нацеливания определяется нуклеотидной последовательностью в направляющей РНК длиной 20 или 24 нуклеотида, которая подвергается спариванию оснований по Уотсону-Крику с целевой ДНК (а также 2 дополнительными основаниями в прилегающей последовательности PAM NAG или NGG в случае Cas9 из *S. pyogenes*). Такая последовательность является достаточно длинной, чтобы быть уникальной в геноме человека, однако специфичность взаимодействия РНК/ДНК не является абсолютной, и иногда допускается значительная разнородность, особенно в 5'-половине целевой последовательности, что эффективно снижает количество оснований, которые определяют специфичность. Одним из решений этой проблемы была полная инактивация каталитической функции Cas9 или Cpf1 с сохранением только РНК-направляемой функции связывания ДНК и вместе с тем слияние домена FokI с инактивированным Cas9; см., например, Tsai et al., *Nature Biotech*, 2014, 32:569-76; и Guilinger et al., *Nature Biotech*, 2014, 32:577-82. Поскольку FokI должен димеризоваться, чтобы стать каталитически активным, необходимы две направляющие РНК, чтобы связать два продукта слияния FokI в непосредственной близости друг к другу для образования димера и расщепления ДНК. Это фактически удваивает количество оснований в

комбинированных целевых сайтах, увеличивая таким образом строгость нацеливания систем на основе CRISPR.

В качестве дополнительного примера при слиянии ДНК-связывающего домена TALE с каталитически активной HE, такой как I-TevI, извлекаются преимущества как из настраиваемого связывания ДНК, так и из специфичности TALE, а также специфичности расщепляющей последовательности I-TevI, при этом ожидается, что нецелевое расщепление можно дополнительно снизить.

РНК-направляемые эндонуклеазы.

РНК-направляемые эндонуклеазные системы, используемые в данном изобретении, могут содержать аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 10%, по меньшей мере 15%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 99 или 100% идентичностью аминокислотной последовательности с иллюстративной эндонуклеазой дикого типа, например, Cas9 из *S. pyogenes*, последовательность ID No: 8 согласно US 2014/0068797 или Sapranaukas et al., *Nucleic Acids Res.*, 39(21):9275-9282 (2011). Эндонуклеаза может характеризоваться по меньшей мере 70, 75, 80, 85, 90, 95, 97, 99 или 100% идентичностью с эндонуклеазой дикого типа (например, Cas9 из *S. pyogenes* выше) на протяжении 10 смежных аминокислот. Эндонуклеаза может характеризоваться не более чем 70, 75, 80, 85, 90, 95, 97, 99 или 100% идентичностью с эндонуклеазой дикого типа (например, Cas9 из *S. pyogenes* выше) на протяжении 10 смежных аминокислот. Эндонуклеаза может характеризоваться по меньшей мере 70, 75, 80, 85, 90, 95, 97, 99 или 100% идентичностью с эндонуклеазой дикого типа (например, Cas9 из *S. pyogenes* выше) на протяжении 10 смежных аминокислот в нуклеазном домене HNH эндонуклеазы. Эндонуклеаза может характеризоваться не более чем 70, 75, 80, 85, 90, 95, 97, 99 или 100% идентичностью с эндонуклеазой дикого типа (например, Cas9 из *S. pyogenes* выше) на протяжении 10 смежных аминокислот в нуклеазном домене HNH эндонуклеазы. Эндонуклеаза может характеризоваться по меньшей мере 70, 75, 80, 85, 90, 95, 97, 99 или 100% идентичностью с эндонуклеазой дикого типа (например, Cas9 из *S. pyogenes* выше) на протяжении 10 смежных аминокислот в нуклеазном домене RuvC эндонуклеазы. Эндонуклеаза может характеризоваться не более чем 70, 75, 80, 85, 90, 95, 97, 99 или 100% идентичностью с эндонуклеазой дикого типа (например, Cas9 из *S. pyogenes* выше) на протяжении 10 смежных аминокислот в нуклеазном домене RuvC эндонуклеазы.

Эндонуклеаза может включать в себя модифицированную форму иллюстративной эндонуклеазы дикого типа. Модифицированная форма иллюстративной эндонуклеазы дикого типа может содержать мутацию, которая снижает активность расщепления нуклеиновой кислоты у эндонуклеазы. Модифицированная форма иллюстративной эндонуклеазы дикого типа может характеризоваться менее чем 90%, менее чем 80%, менее чем 70%, менее чем 60%, менее чем 50%, менее чем 40%, менее чем 30%, менее чем 20%, менее чем 10%, менее чем 5% или менее чем 1% активностью расщепления нуклеиновой кислоты, характерной для иллюстративной эндонуклеазы дикого типа (например, Cas9 из *S. pyogenes* выше). У модифицированной формы эндонуклеазы может отсутствовать значительная активностью расщепления нуклеиновой кислоты. Если эндонуклеаза представляет собой модифицированную форму, у которой отсутствует значительная активность расщепления нуклеиновой кислоты, она называется в данном изобретении "ферментативно неактивной".

Рассматриваемые мутации могут предусматривать замены, добавления и делеции или любую их комбинацию. Мутация превращает мутированную аминокислоту в аланин. Мутация превращает мутированную аминокислоту в другую аминокислоту (например, глицин, серин, треонин, цистеин, валин, лейцин, изолейцин, метионин, пролин, фенилаланин, тирозин, триптофан, аспарагиновую кислоту, глутаминовую кислоту, аспарагин, глутамин, гистидин, лизин или аргинин). Мутация превращает мутированную аминокислоту в неприродную аминокислоту (например, селенометионин). Мутация превращает мутированную аминокислоту в миметики аминокислот (например, фосфомиметики). Мутация может быть консервативной мутацией. Например, мутация превращает мутированную аминокислоту в аминокислоты, которые напоминают мутированные аминокислоты по размеру, форме, заряду, полярности, конформации и/или ротамерам (например, мутация цистеин/серин, мутация лизин/аспарагин, мутация гистидин/фенилаланин). Мутация может вызывать сдвиг рамки считывания и/или образование преждевременного стоп-кодона. Мутация может вызывать изменения в регуляторных участках генов или локусов, которые влияют на экспрессию одного или нескольких генов.

Направляющие РНК.

В настоящем изобретении представлены направляющие РНК (gRNA), которые могут направлять активности ассоциированной эндонуклеазы на специфический целевой сайт в полинуклеотиде. Направляющая РНК может содержать по меньшей мере спейсерную последовательность, которая гибридизируется с последовательностью целевой нуклеиновой кислоты, представляющей интерес, и последовательность повтора CRISPR. В системах CRISPR типа II gRNA также содержит вторую РНК, называемую последовательностью tracrRNA. В направляющей РНК (gRNA) CRISPR типа II последовательность повтора CRISPR и последовательность tracrRNA гибридизируются друг с другом с

образованием дуплекса. В системах CRISPR типа V gRNA содержит crRNA, которая образует дуплекс. В некоторых вариантах осуществления gRNA может связывать эндонуклеазу, вследствие чего gRNA и эндонуклеаза образуют комплекс. GRNA может обеспечивать целевую специфичность по отношению к комплексу благодаря его ассоциации с эндонуклеазой. Таким образом, нуклеиновая кислота, нацеливающая на геном, может направлять активность эндонуклеазы.

Иллюстративные направляющие РНК включают спейсерные последовательности, которые включают 15-200 нуклеотидов, при этом gRNA нацеливает на местоположение генома на основе сборки генома человека GRCh38. Специалисту средней квалификации в данной области техники понятно, что каждая gRNA может быть разработана таким образом, чтобы она содержала спейсерную последовательность, которая комплементарна ее геномному целевому сайту или целевому участку. См. Jinek et al., *Science*, 2012, 337, 816-821; и Deltcheva et al., *Nature*, 2011, 471, 602-607.

gRNA может быть двухмолекулярной направляющей РНК. gRNA может быть одномолекулярной направляющей РНК.

Двухмолекулярная направляющая РНК может содержать две нити РНК. Первая нить содержит в направлении от 5'- к 3'-концу необязательную последовательность удлинения спейсера, спейсерную последовательность и минимальную последовательность повтора CRISPR. Вторая нить может содержать минимальную последовательность tracrRNA (комплементарную минимальной последовательности повтора CRISPR), 3'-последовательность tracrRNA и необязательную последовательность, удлиняющую tracrRNA.

Направляющая РНК, состоящая из одной молекулы (sgRNA), может содержать в направлении от 5'- к 3'-концу необязательную последовательность удлинения спейсера, спейсерную последовательность, минимальную последовательность повтора CRISPR, линкер направляющей последовательности, состоящей из одной молекулы, минимальную последовательность tracrRNA, 3'-последовательность tracrRNA и необязательную последовательность удлинения tracrRNA. Необязательная последовательность, удлиняющая tracrRNA, может содержать элементы, которые придают направляющей РНК дополнительные функциональные свойства (например, стабильность). Линкер направляющей последовательности, состоящей из одной молекулы, может связывать минимальный повтор CRISPR и минимальную последовательность tracrRNA с образованием шпильчатой структуры. Необязательная последовательность, удлиняющая tracrRNA, может содержать одну или несколько шпилек.

В некоторых вариантах осуществления sgRNA содержит спейсерную последовательность из 20 нуклеотидов на 5'-конце последовательности sgRNA. В некоторых вариантах осуществления sgRNA содержит спейсерную последовательность из менее чем 20 нуклеотидов на 5'-конце последовательности sgRNA. В некоторых вариантах осуществления sgRNA содержит спейсерную последовательность из более чем 20 нуклеотидов на 5'-конце последовательности sgRNA. В некоторых вариантах осуществления sgRNA содержит спейсерную последовательность варьирующей длины с 17-30 нуклеотидами на 5'-конце последовательности sgRNA. В некоторых вариантах осуществления sgRNA содержит последовательность удлинения спейсера длиной более 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180 или 200 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления sgRNA содержит последовательность удлинения спейсера длиной менее 3, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90 или 100 нуклеотидов.

В некоторых вариантах осуществления sgRNA содержит последовательность удлинения спейсера, которая содержит другой фрагмент (например, последовательность, контролирующую стабильность, последовательность, связывающую эндорибонуклеазу, рибозим). Фрагмент может уменьшать или увеличивать стабильность нуклеиновой кислоты, нацеливающейся на нуклеиновую кислоту. Фрагмент может представлять собой сегмент терминатора транскрипции (т.е. последовательность терминации транскрипции). Фрагмент может функционировать в эукариотической клетке. Фрагмент может функционировать в прокариотической клетке. Фрагмент функционирует как в эукариотических, так и в прокариотических клетках. Неограничивающие примеры подходящих фрагментов включают: 5'-кэп (например, 7-метилгуанилатный кэп (m7G)), последовательность рибопереклочателя (например, для обеспечения регуляции стабильности и/или регуляции доступности для белков и белковых комплексов), последовательность, которая образует dsRNA-дуплекс (т.е. шпильку), последовательность, которая нацеливает РНК в место субклеточной локализации (например, ядро, митохондрии, хлоропласты и т.п.), модификацию или последовательность, которая обеспечивает отслеживание (например, прямое конъюгирование с флуоресцентной молекулой, конъюгирование с фрагментом, который облегчает флуоресцентную детекцию, последовательность, которая обеспечивает флуоресцентную детекцию и т.д.), и/или модификацию или последовательность, которая предоставляет сайт связывания для белков (например, белков, которые воздействуют на ДНК, в том числе активаторов транскрипции, репрессоров транскрипции, ДНК-метилтрансфераз, ДНК-деметилаз, гистонацетилтрансфераз, гистондеацетилаз и т.п.).

В некоторых вариантах осуществления sgRNA содержит спейсерную последовательность, которая гибридизируется с последовательностью в целевом полинуклеотиде. Спейсер gRNA может взаимодействовать с целевым полинуклеотидом, специфичным в отношении последовательности

образом посредством гибридизации (т.е. спаривания оснований). Нуклеотидная последовательность спейсера может варьироваться в зависимости от последовательности целевой нуклеиновой кислоты, представляющей интерес.

В системе CRISPR-эндонуклеаза спейсерная последовательность может быть разработана таким образом, чтобы она гибридизовалась с целевым полинуклеотидом, который расположен в 5'-направлении от РАМ эндонуклеазы, используемой в системе. Спейсер может полностью соответствовать целевой последовательности или может иметь несоответствия. Для каждой эндонуклеазы, например нуклеазы Cas9, имеется конкретная последовательность РАМ, которую она распознает в целевой ДНК. Например, Cas9 из *S. pyogenes* распознает РАМ, который содержит последовательность 5'-NRG-3', где R представляет собой А либо G, где N представляет собой любой нуклеотид, и при этом N находится непосредственно рядом с последовательностью целевой нуклеиновой кислоты, на которую нацеливается спейсерная последовательность, в 3'-направлении от нее.

Целевая полинуклеотидная последовательность может содержать 20 нуклеотидов. Целевой полинуклеотид может содержать менее 20 нуклеотидов. Целевой полинуклеотид может содержать более 20 нуклеотидов. Целевой полинуклеотид может содержать по меньшей мере 5, 10, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30 или больше нуклеотидов. Целевой полинуклеотид может содержать не более 5, 10, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30 или больше нуклеотидов. Целевая полинуклеотидная последовательность может содержать 20 оснований непосредственно рядом с первым нуклеотидом РАМ в 5'-направлении.

Спейсерная последовательность, которая гибридизируется с целевым полинуклеотидом, может иметь длину, составляющую по меньшей мере приблизительно 6 нуклеотидов (нт). Спейсерная последовательность может содержать по меньшей мере приблизительно 6 нт, по меньшей мере приблизительно 10 нт, по меньшей мере приблизительно 15 нт, по меньшей мере приблизительно 18 нт, по меньшей мере приблизительно 19 нт, по меньшей мере приблизительно 20 нт, по меньшей мере приблизительно 25 нт, по меньшей мере приблизительно 30 нт, по меньшей мере приблизительно 35 нт или по меньшей мере приблизительно 40 нт, от приблизительно 6 нт до приблизительно 80 нт, от приблизительно 6 нт до приблизительно 50 нт, от приблизительно 6 нт до приблизительно 45 нт, от приблизительно 6 нт до приблизительно 40 нт, от приблизительно 6 нт до приблизительно 35 нт, от приблизительно 6 нт до приблизительно 30 нт, от приблизительно 6 нт до приблизительно 25 нт, от приблизительно 6 нт до приблизительно 20 нт, от приблизительно 6 нт до приблизительно 19 нт, от приблизительно 10 нт до приблизительно 50 нт, от приблизительно 10 нт до приблизительно 45 нт, от приблизительно 10 нт до приблизительно 40 нт, от приблизительно 10 нт до приблизительно 35 нт, от приблизительно 10 нт до приблизительно 30 нт, от приблизительно 10 нт до приблизительно 25 нт, от приблизительно 10 нт до приблизительно 20 нт, от приблизительно 10 нт до приблизительно 19 нт, от приблизительно 19 нт до приблизительно 25 нт, от приблизительно 19 нт до приблизительно 30 нт, от приблизительно 19 нт до приблизительно 35 нт, от приблизительно 19 нт до приблизительно 40 нт, от приблизительно 19 нт до приблизительно 45 нт, от приблизительно 19 нт до приблизительно 50 нт, от приблизительно 19 нт до приблизительно 60 нт, от приблизительно 20 нт до приблизительно 25 нт, от приблизительно 20 нт до приблизительно 30 нт, от приблизительно 20 нт до приблизительно 35 нт, от приблизительно 20 нт до приблизительно 40 нт, от приблизительно 20 нт до приблизительно 45 нт, от приблизительно 20 нт до приблизительно 50 нт или от приблизительно 20 нт до приблизительно 60 нт. В некоторых примерах спейсерная последовательность может содержать 20 нуклеотидов. В некоторых примерах спейсер может содержать 19 нуклеотидов. В некоторых примерах спейсер может содержать 18 нуклеотидов. В некоторых примерах спейсер может содержать 22 нуклеотида.

В некоторых примерах процент комплементарности между спейсерной последовательностью и целевой нуклеиновой кислотой составляет по меньшей мере приблизительно 30%, по меньшей мере приблизительно 40%, по меньшей мере приблизительно 50%, по меньшей мере приблизительно 60%, по меньшей мере приблизительно 65%, по меньшей мере приблизительно 70%, по меньшей мере приблизительно 75%, по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 85%, по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 95%, по меньшей мере приблизительно 97%, по меньшей мере приблизительно 98%, по меньшей мере приблизительно 99% или 100%. В некоторых примерах процент комплементарности между спейсерной последовательностью и целевой нуклеиновой кислотой составляет не более приблизительно 30%, не более приблизительно 40%, не более приблизительно 50%, не более приблизительно 60%, не более приблизительно 65%, не более приблизительно 70%, не более приблизительно 75%, не более приблизительно 80%, не более приблизительно 85%, не более приблизительно 90%, не более приблизительно 95%, не более приблизительно 97%, не более приблизительно 98%, не более приблизительно 99% или 100%. В некоторых примерах процент комплементарности между спейсерной последовательностью и целевой нуклеиновой кислотой составляет 100% на протяжении шести смежных нуклеотидов, наиболее близких к 5'-концу целевой последовательности комплементарной нити целевой нуклеиновой кислоты. Процент комплементарности между спейсерной последовательностью и целевой нуклеиновой кислотой может составлять по меньшей мере 60% на протяжении приблизительно 20 смежных нуклеотидов. Длина

спейсерной последовательности и целевой нуклеиновой кислоты может отличаться на 1-6 нуклеотидов, которые можно рассматривать как выпетливание или выпетливания.

Последовательность *tracrRNA* может содержать нуклеотиды, которые гибридизируются с минимальной последовательностью повтора CRISPR в клетке. Минимальная последовательность *tracrRNA* и минимальная последовательность повтора CRISPR могут образовывать дуплекс, т.е. двухнитевую структуру со спаренными основаниями. Минимальная последовательность *tracrRNA* и минимальный повтор CRISPR совместно связываются с РНК-направляемой эндонуклеазой. По меньшей мере часть минимальной последовательности *tracrRNA* может гибридизоваться с минимальной последовательностью повтора CRISPR. Минимальная последовательность *tracrRNA* может быть на по меньшей мере приблизительно 30%, приблизительно 40%, приблизительно 50%, приблизительно 60%, приблизительно 65%, приблизительно 70%, приблизительно 75%, приблизительно 80%, приблизительно 85%, приблизительно 90%, приблизительно 95% или 100% комплементарной минимальной последовательности повтора CRISPR.

Минимальная последовательность *tracrRNA* может иметь длину от приблизительно 7 нуклеотидов до приблизительно 100 нуклеотидов. Например, длина минимальной последовательности *tracrRNA* может составлять от приблизительно 7 нуклеотидов (нт) до приблизительно 50 нт, от приблизительно 7 нт до приблизительно 40 нт, от приблизительно 7 нт до приблизительно 30 нт, от приблизительно 7 нт до приблизительно 25 нт, от приблизительно 7 нт до приблизительно 20 нт, от приблизительно 7 нт до приблизительно 15 нт, от приблизительно 8 нт до приблизительно 40 нт, от приблизительно 8 нт до приблизительно 30 нт, от приблизительно 8 нт до приблизительно 25 нт, от приблизительно 8 нт до приблизительно 20 нт, от приблизительно 8 нт до приблизительно 15 нт, от приблизительно 15 нт до приблизительно 100 нт, от приблизительно 15 нт до приблизительно 80 нт, от приблизительно 15 нт до приблизительно 50 нт, от приблизительно 15 нт до приблизительно 40 нт, от приблизительно 15 нт до приблизительно 30 нт или от приблизительно 15 нт до приблизительно 25 нт. Минимальная последовательность *tracrRNA* может иметь длину примерно 9 нуклеотидов. Минимальная последовательность *tracrRNA* может иметь длину примерно 12 нуклеотидов. Минимальная *tracrRNA* может состоять из нт 23-48 *tracrRNA*, как описано у Jinek et al выше.

Минимальная последовательность *tracrRNA* может быть на по меньшей мере приблизительно 60% идентична референтной минимальной последовательности *tracrRNA* (например, дикого типа, *tracrRNA* из *S. pyogenes*) на протяжении отрезка из по меньшей мере 6, 7 или 8 смежных нуклеотидов. Например, минимальная последовательность *tracrRNA* может быть на по меньшей мере приблизительно 65% идентична, приблизительно 70% идентична, приблизительно 75% идентична, приблизительно 80% идентична, приблизительно 85% идентична, приблизительно 90% идентична, приблизительно 95% идентична, приблизительно 98% идентична, приблизительно 99% идентична или 100% идентична референтной минимальной последовательности *tracrRNA* на протяжении отрезка из по меньшей мере 6, 7 или 8 смежных нуклеотидов.

Дуплекс между минимальной РНК CRISPR и минимальной *tracrRNA* может содержать двойную спираль. Дуплекс между минимальной РНК CRISPR и минимальной *tracrRNA* может содержать по меньшей мере приблизительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 или больше нуклеотидов. Дуплекс между минимальной РНК CRISPR и минимальной *tracrRNA* может содержать не более приблизительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 или больше нуклеотидов.

Дуплекс может содержать ошибочное спаривание (т.е. две нити дуплекса не являются комплементарными на 100%). Дуплекс может содержать по меньшей мере приблизительно 1, 2, 3, 4 или 5 ошибочных спариваний. Дуплекс может содержать не более приблизительно 1, 2, 3, 4 или 5 ошибочных спариваний. Дуплекс может содержать не более 2 ошибочных спаривания.

В некоторых вариантах осуществления *tracrRNA* может представлять собой 3'-*tracrRNA*. В некоторых вариантах осуществления 3'-последовательность *tracrRNA* может содержать последовательность, характеризующуюся по меньшей мере приблизительно 30%, приблизительно 40%, приблизительно 50%, приблизительно 60%, приблизительно 65%, приблизительно 70%, приблизительно 75%, приблизительно 80%, приблизительно 85%, приблизительно 90%, приблизительно 95% или 100% идентичностью последовательности с референтной последовательностью *tracrRNA* (например, *tracrRNA* из *S. pyogenes*).

В некоторых вариантах осуществления *gRNA* может содержать последовательность удлинения *tracrRNA*. Последовательность удлинения *tracrRNA* может иметь длину от приблизительно 1 нуклеотида до приблизительно 400 нуклеотидов. Последовательность удлинения *tracrRNA* может иметь длину более 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180 или 200 нуклеотидов. Последовательность удлинения *tracrRNA* может иметь длину от приблизительно 20 до приблизительно 5000 или больше нуклеотидов. Последовательность удлинения *tracrRNA* может иметь длину менее 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90 или 100 нуклеотидов. Последовательность удлинения *tracrRNA* может содержать менее 10 нуклеотидов в длину. Последовательность удлинения *tracrRNA* может иметь длину 10-30 нуклеотидов. Последовательность удлинения *tracrRNA* может иметь длину 30-70 нуклеотидов.

Последовательность удлинения *tracrRNA* может содержать функциональный фрагмент (например,

последовательность, контролирующую стабильность, рибозим, последовательность, связывающую эндорибонуклеазу). Функциональный фрагмент может содержать сегмент терминатора транскрипции (т.е. последовательность терминации транскрипции). Функциональный фрагмент может иметь общую длину, составляющую от приблизительно 10 нуклеотидов (нт) до приблизительно 100 нуклеотидов, от приблизительно 10 нт до приблизительно 20 нт, от приблизительно 20 нт до приблизительно 30 нт, от приблизительно 30 нт до приблизительно 40 нт, от приблизительно 40 нт до приблизительно 50 нт, от приблизительно 50 нт до приблизительно 60 нт, от приблизительно 60 нт до приблизительно 70 нт, от приблизительно 70 нт до приблизительно 80 нт, от приблизительно 80 нт до приблизительно 90 нт или от приблизительно 90 нт до приблизительно 100 нт, от приблизительно 15 нт до приблизительно 80 нт, от приблизительно 15 нт до приблизительно 50 нт, от приблизительно 15 нт до приблизительно 40 нт, от приблизительно 15 нт до приблизительно 30 нт или от приблизительно 15 нт до приблизительно 25 нт.

В некоторых вариантах осуществления sgRNA может содержать линкерную последовательность длиной от приблизительно 3 нуклеотидов до приблизительно 100 нуклеотидов. У Jinek et al. выше, например, использовали простую 4-нуклеотидную "тетрапетлю" (-GAAA-) (Jinek et al., Science, 2012, 337(6096):816-821). Иллюстративный линкер имеет длину, составляющую от приблизительно 3 нуклеотидов (нт) до приблизительно 90 нт, от приблизительно 3 нт до приблизительно 80 нт, от приблизительно 3 нт до приблизительно 70 нт, от приблизительно 3 нт до приблизительно 60 нт, от приблизительно 3 нт до приблизительно 50 нт, от приблизительно 3 нт до приблизительно 40 нт, от приблизительно 3 нт до приблизительно 30 нт, от приблизительно 3 нт до приблизительно 20 нт, от приблизительно 3 нт до приблизительно 10 нт. Например, линкер может иметь длину, составляющую от приблизительно 3 нт до приблизительно 5 нт, от приблизительно 5 нт до приблизительно 10 нт, от приблизительно 10 нт до приблизительно 15 нт, от приблизительно 15 нт до приблизительно 20 нт, от приблизительно 20 нт до приблизительно 25 нт, от приблизительно 25 нт до приблизительно 30 нт, от приблизительно 30 нт до приблизительно 35 нт, от приблизительно 35 нт до приблизительно 40 нт, от приблизительно 40 нт до приблизительно 50 нт, от приблизительно 50 нт до приблизительно 60 нт, от приблизительно 60 нт до приблизительно 70 нт, от приблизительно 70 нт до приблизительно 80 нт, от приблизительно 80 нт до приблизительно 90 нт или от приблизительно 90 нт до приблизительно 100 нт. Линкер направляющей нуклеиновой кислоты, состоящей из одной нуклеиновой кислоты, может содержать от 4 до 40 нуклеотидов. Линкер может содержать по меньшей мере приблизительно 100, 500, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 4500, 5000, 5500, 6000, 6500 или 7000 или более нуклеотидов. Линкер может содержать не более чем приблизительно 100, 500, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 4500, 5000, 5500, 6000, 6500 или 7000 или больше нуклеотидов.

Линкеры могут содержать любую из совокупности последовательностей, хотя в некоторых примерах линкер не будет содержать последовательностей, которые имеют обширные участки гомологии с другими частями направляющей РНК, что может вызывать внутримолекулярное связывание, которое может создавать помехи для других функциональных участков направляющей нуклеиновой кислоты. У Jinek et al. выше использовали простую 4-нуклеотидную последовательность -GAAA- (Jinek et al., Science, 2012, 337(6096):816-821), но также можно использовать множество других последовательностей, в том числе более длинные последовательности.

Линкерная последовательность может содержать функциональный фрагмент. Например, линкерная последовательность может содержать один или несколько характерных элементов, в том числе аптамер, рибозим, шпильку, взаимодействующую с белком, сайт связывания белка, массив CRISPR, интрон или экзон. Линкерная последовательность может содержать по меньшей мере приблизительно 1, 2, 3, 4 или 5 или больше функциональных фрагментов. В некоторых примерах линкерная последовательность может содержать не более приблизительно 1, 2, 3, 4 или 5 или больше функциональных фрагментов.

В некоторых вариантах осуществления sgRNA не содержит урацил, например на 3'-конце последовательности sgRNA. В некоторых вариантах осуществления sgRNA содержит один или несколько остатков урацила, например на 3'-конце последовательности sgRNA. В некоторых вариантах осуществления sgRNA содержит 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 остатков урацила (U) на 3'-конце последовательности sgRNA.

SgRNA может быть химически модифицированной. В некоторых вариантах осуществления химически модифицированная gRNA представляет собой gRNA, которая содержит по меньшей мере один нуклеотид с химической модификацией, например 2'-О-метил-модификацией сахара. В некоторых вариантах осуществления химически модифицированная gRNA содержит модифицированный каркас нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления химически модифицированная gRNA содержит 2'-О-метил-фосфоротиоатный остаток. В некоторых вариантах осуществления химические модификации усиливают стабильность, снижают вероятность или степень врожденного иммунного ответа и/или усиливают другие признаки, что описано в уровне техники.

В некоторых вариантах осуществления модифицированная gRNA может содержать модифицированные каркасы, например фосфоротиоатные, фосфотриэфирные, морфолиновые, метилфосфонатные связи, короткоцепочечные алкильные или циклоалкильные связи между сахарными фрагментами или короткоцепочечные гетероатомные или гетероциклические связи между сахарными

фрагментами.

Морфолиновые соединения описаны в Braasch and David Corey, *Biochemistry*, 2002, 41(14):4503-4510; Genesis, 2001, vol. 30, issue 3; Heasman, *Dev. Biol.*, 2002, 243:209-214; Nasevicius et al., *Nat. Genet.*, 2000, 26:216-220; Lacerra et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2000, 97:9591-9596; и патенте США № 5034506, выданном 23 июля 1991 г.

Миметики олигонуклеотидов, представляющие собой циклогексенильные нуклеиновые кислоты, описаны в Wang et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 2000, 122:8595-8602.

В некоторых вариантах осуществления модифицированная gRNA может содержать один или несколько замещенных сахарных фрагментов, например один из следующих в 2'-положении: OH, SH, SCH<sub>3</sub>, F, OCN, OCH<sub>3</sub>, OCH<sub>3</sub>, O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CH<sub>3</sub>, O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>NH<sub>2</sub> или O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CH<sub>3</sub>, где n равняется от 1 до приблизительно 10; низшего C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>алкила, алкоксиалкокси, замещенного низшего алкила, алкарила или аралкила; Cl; Br; CN; CF<sub>3</sub>; OCF<sub>3</sub>; O-, S- или N-алкила; O-, S- или N-алкенила; SOCH<sub>3</sub>; SO<sub>2</sub> CH<sub>3</sub>; ONO<sub>2</sub>; NO<sub>2</sub>; N<sub>3</sub>; NH<sub>2</sub>; гетероциклоалкила; гетероциклоалкарила; аминокиламино; полиалкиламино; замещенного силила; группы, расщепляющей РНК; репортерной группы; интеркалятора; 2'-O-(2-метоксиэтила); 2'-метокси (2'-O-CH<sub>3</sub>); 2'-пропокси (2'-OCH<sub>2</sub> CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>) и 2'-фтор (2'-F). Аналогичные модификации можно также производить в других положениях gRNA, в частности в 3'-положении сахарного фрагмента в 3'-концевом нуклеотиде и в 5'-положении в 5'-концевом нуклеотиде. В некоторых примерах как сахарный фрагмент, так и межнуклеозидная связь, т.е. каркас, в нуклеотидных звеньях могут быть заменены новыми группами.

Направляющие РНК могут также содержать, дополнительно или альтернативно, модификации или замещения нуклеиновых оснований (часто называемых в данной области техники просто "основаниями"). Используемые в данном изобретении "немодифицированные" или "природные" нуклеиновые основания включают аденин (A), гуанин (G), тимин (T), цитозин (C) и урацил (U). Модифицированные нуклеиновые основания включают нуклеиновые основания, которые в природных нуклеиновых кислотах встречаются не часто или лишь временно, например, гипоксантин, 6-метиладенин, 5-Ме-пиримидины, в частности, 5-метилцитозин (также называемый 5-метил-2'-дезоксцитозин и часто называемый в данной области техники 5-Ме-С), 5-гидроксиметилцитозин (НМС), гликозил-НМС и гентобиозил-НМС, а также синтетические нуклеиновые основания, например, 2-аминоаденин, 2-(метиламино)аденин, 2-(имидазолилалкил)аденин, 2-(аминоалкиламино)аденин или другие гетерозамещенные алкиладенины, 2-тиоурацил, 2-тиотимин, 5-бромурацил, 5-гидроксиметилурацил, 8-азагуанин, 7-дезазагуанин, N<sup>6</sup>-(6-аминогексил)аденин и 2,6-диаминопурин. Kornberg, A., *DNA Replication*, W.H. Freeman & Co., San Francisco, p. 75-77, 1980; Gebeyehu et al., *Nucl. Acids Res.*, 1997, 15:4513. Также может быть включено "универсальное" основание, известное из уровня техники, например инозин. Было показано, что замещения на 5-Ме-С увеличивают стабильность дуплекса нуклеиновых кислот на 0,6-1,2°C (Sanghvi, Y.S., в Crooke, S.T., Lebleu, B., eds., *Antisense Research and Applications*, CRC Press, Boca Raton, 1993, p. 276-278) и представляют собой аспекты замещений оснований.

Модифицированные нуклеиновые основания могут включать другие синтетические и природные нуклеиновые основания, такие как 5-метилцитозин (5-me-C), 5-гидроксиметилцитозин, ксантин, гипоксантин, 2-аминоаденин, 6-метильные и другие алкильные производные аденина и гуанина, 2-пропильные и другие алкильные производные аденина и гуанина, 2-тиоурацил, 2-тиотимин и 2-тиоцитозин, 5-галогенурацил и цитозин, 5-пропинилурацил и цитозин, 6-азоурацил, цитозин и тимин, 5-урацил (псевдоурацил), 4-тиоурацил, 8-галоген-, 8-амино-, 8-тиол-, 8-тиоалкил-, 8-гидроксил- и другие 8-замещенные аденины и гуанины, 5-галоген-, в частности 5-бром-, 5-трифторметил- и другие 5-замещенные урацилы и цитозины, 7-метилгуанин и 7-метиладенин, 8-азагуанин и 8-азааденин, 7-дезазагуанин и 7-дезазааденин, а также 3-дезазагуанин и 3-дезазааденин.

Комплексы нуклеиновой кислоты, нацеливающейся на геном, и эндонуклеазы.

gRNA взаимодействует с эндонуклеазой (например, РНК-направляемой нуклеазой, такой как Cas9) с образованием таким образом комплекса. gRNA направляет эндонуклеазу на целевой полинуклеотид.

Каждую из эндонуклеазы и gRNA можно вводить по отдельности в клетку или субъекту. В некоторых вариантах осуществления эндонуклеаза может быть предварительно составлена в комплексе с одной или несколькими направляющими РНК или с одной или несколькими crRNA вместе с tracrRNA. Такой материал в виде предварительно образованного комплекса затем можно вводить в клетку или субъекту. Такой материал в виде предварительно образованного комплекса известен как рибонуклеопротеиновая частица (RNP). Эндонуклеаза в RNP может представлять собой, например, эндонуклеазу Cas9 или эндонуклеазу Cpf1. Эндонуклеаза может быть фланкирована на N-конце, C-конце или и на N-конце, и на C-конце одним или несколькими сигналами ядерной локализации (NLS). Например, эндонуклеаза Cas9 может быть фланкирована двумя NLS, одним NLS, расположенным на N-конце, и вторым NLS, расположенным на C-конце. NLS может быть любым NLS, известным из уровня техники, таким как NLS SV40. Молярное соотношение нуклеиновой кислоты, нацеленной на геном, и эндонуклеазы в RNP может находиться в диапазоне от приблизительно 1:1 до приблизительно 10:1. Например, молярное соотношение sgRNA и эндонуклеазы Cas9 в RNP может составлять 3:1.

Компоненты системы, кодирующей нуклеиновые кислоты.

В настоящем изобретении представлена нуклеиновая кислота, содержащая нуклеотидную последовательность, кодирующую нуклеиновую кислоту, нацеливающуюся на геном, по настоящему изобретению, эндонуклеазу по настоящему изобретению и/или любую нуклеиновую кислоту или белковую молекулу, необходимую для реализации аспектов способов по настоящему изобретению. Кодирующие нуклеиновые кислоты могут представлять собой РНК, ДНК или их комбинацию.

Нуклеиновая кислота, кодирующая нуклеиновую кислоту, нацеливающуюся на геном, по настоящему изобретению, эндонуклеазу по настоящему изобретению и/или любую нуклеиновую кислоту или белковую молекулу, необходимую для реализации аспектов способов по настоящему изобретению, может предусматривать вектор (например, рекомбинантный вектор экспрессии).

Термин "вектор" означает молекулу нуклеиновой кислоты, способную транспортировать другую нуклеиновую кислоту, с которой она связана. Один из типов векторов представляет собой "плазмиду", которая означает кольцевую двухнитевую петлю ДНК, с которой можно лигировать дополнительные сегменты нуклеиновой кислоты. Другим типом вектора является вирусный вектор, при этом дополнительные сегменты нуклеиновой кислоты можно лигировать с вирусным геномом. Некоторые векторы способны к автономной репликации в клетке-хозяине, в которую они введены (например, бактериальные векторы, имеющие бактериальную точку начала репликации, и эписомальные векторы для экспрессии у млекопитающих). Другие векторы (например, неэписомальные векторы для экспрессии у млекопитающих) интегрируются в геном клетки-хозяина после введения в клетку-хозяина и, таким образом, реплицируются вместе с геномом клетки-хозяина.

В некоторых примерах векторы могут быть способны направлять экспрессию нуклеиновых кислот, с которыми они функционально связаны. Такие векторы упоминаются в данном изобретении как "рекомбинантные векторы экспрессии" или, проще говоря, "векторы экспрессии", которые выполняют эквивалентные функции.

Термин "функционально связанный" означает, что нуклеотидная последовательность, представляющая интерес, связана с регуляторной(регуляторными) последовательность(ями) таким образом, при котором обеспечивается экспрессия нуклеотидной последовательности. Термин "регуляторная последовательность" предполагается как включающий, например, промоторы, энхансеры и другие элементы, контролирующие экспрессию (например, сигналы полиаденилирования). Такие регуляторные последовательности хорошо известны из уровня техники и описаны, например, в Goeddel; Gene Expression Technology: Methods in Enzymology, 1990, 185, Academic Press, San Diego, CA. Регуляторные последовательности включают последовательности, которые управляют конститутивной экспрессией нуклеотидной последовательности во многих типах клеток-хозяев, и последовательности, которые управляют экспрессией нуклеотидной последовательности только в определенных клетках-хозяевах (например, тканеспецифичные регуляторные последовательности). Специалистам в данной области техники будет понятно, что конструкция вектора экспрессии может зависеть от таких факторов, как выбор целевой клетки, необходимый уровень экспрессии и т.п.

Рассматриваемые векторы экспрессии включают без ограничения вирусные векторы на основе вируса осповакцины, вируса полиомиелита, аденовируса, аденоассоциированного вируса, SV40, вируса простого герпеса, вируса иммунодефицита человека, ретровируса (например, векторы на основе вируса лейкоза мышей, вируса некроза селезенки и векторы, полученные из ретровирусов, таких как вирус саркомы Рауса, вирус саркомы Харви, вирус лейкоза птиц, лентивирус, вирус иммунодефицита человека, вирус миелолифферативной саркомы и вирус рака молочной железы), а также другие рекомбинантные векторы. Другие векторы, рассматриваемые для эукариотических целевых клеток, включают без ограничения векторы рXT1, рSG5, рSVK3, рBPV, рMSG и рSVLSV40 (Pharmacia). Другие векторы можно применять при условии совместимости с клеткой-хозяином.

В некоторых примерах вектор может содержать один или несколько элементов, контролирующих транскрипцию и/или трансляцию. В зависимости от используемой системы хозяин/вектор любой из ряда подходящих элементов, контролирующих транскрипцию и трансляцию, в том числе конститутивные и индуцируемые промоторы, энхансерные элементы транскрипции, терминаторы транскрипции и т.д., можно использовать в векторе экспрессии. Вектор может представлять собой самоинактивирующийся вектор, который инактивирует вирусные последовательности или компоненты аппарата CRISPR либо другие элементы.

Неограничивающие примеры подходящих эукариотических промоторов (т.е. промоторов, функционирующих в эукариотической клетке) включают промоторы немедленно-ранних генов цитомегаловируса (CMV), гена тимидинкиназы вируса простого герпеса (HSV), ранних и поздних генов SV40, длинных концевых повторов (LTR) ретровируса, промотор гена человеческого фактора элонгации-1 (EF1 $\alpha$ ), промотор гена куриного бета-актина (CBA), промотор гена убиквитина С (UBC), гибридную конструкцию, содержащую энхансер цитомегаловируса, слитый с промотором гена куриного бета-актина (CAG), гибридную конструкцию, содержащую энхансер цитомегаловируса, слитый с промотором, первым экзоном и первым интроном гена куриного бета-актина (CAG или CAGGS), промотор вируса стволовых клеток мыши (MSCV), промотор локуса гена фосфолицераткиназы-1 (PGK) и промотор гена

металлотионеина-I мыши.

Промотор может представлять собой индуцируемый промотор (например, промотор генов, кодирующих белки теплового шока, промотор, регулируемый тетрациклином, промотор, регулируемый стероидами, промотор, регулируемый ионами металлов, промотор, регулируемый рецептором эстрогенов, и т.д.). Промотор может быть конститутивным промотором (например, промотором CMV, промотором UBC, промотором CAG). В некоторых случаях промотор может представлять собой промотор, функция которого ограничена в пространстве и/или ограничена во времени (например, тканеспецифический промотор, клеточноспецифический промотор и т.д.).

Введение комплексов, полипептидов и нуклеиновых кислот по настоящему изобретению в клетки может происходить посредством инфицирования вирусами или бактериофагами, трансфекции, конъюгации, слияния протопластов, липофекции, электропорации, нуклеофекции, осаждения фосфатом кальция, трансфекции, опосредованной полиэтиленимином (PEI), трансфекции, опосредованной DEAE-декстраном, трансфекции, опосредованной липосомами, технологии биобаллистической пушки, осаждения фосфатом кальция, прямой микроинъекции, доставки нуклеиновых кислот, опосредованной наночастицами, и т.п.

### III. Стратегии ускользания от иммунного ответа и повышенной выживаемости.

В данном изобретении описаны стратегии, позволяющие генетически модифицированным клеткам, т.е. универсальным донорским клеткам, увеличивать свою выживаемость или жизнеспособность и/или ускользать от иммунного ответа после приживления трансплантата у субъекта. В некоторых вариантах осуществления эти стратегии позволяют универсальным донорским клеткам выживать и/или ускользать от иммунного ответа с более высокими показателями успеха, чем у немодифицированных клеток. В некоторых вариантах осуществления для генетически модифицированных клеток предусмотрено введение по меньшей мере одной генетической модификации в пределах по меньшей мере одного гена, который кодирует фактор выживания, или рядом с ним, где генетическая модификация предусматривает вставку полинуклеотида, кодирующего толерогенный фактор. Универсальные донорские клетки могут дополнительно содержать по меньшей мере одну генетическую модификацию в пределах гена, который кодирует один или несколько человеческих лейкоцитарных антигенов MHC-I или MHC-II, или компонент, или регулятор транскрипции комплекса MHC-I или MHC-II, или рядом с ним, где указанная генетическая модификация предусматривает вставку полинуклеотида, кодирующего второй толерогенный фактор.

В некоторых вариантах осуществления для генетически модифицированных клеток предусмотрено введение по меньшей мере одной генетической модификации в пределах по меньшей мере одного гена или рядом с ним, которая снижает экспрессию одного или нескольких человеческих лейкоцитарных антигенов MHC-I и MHC-II по сравнению с немодифицированной клеткой; по меньшей мере одной генетической модификации, которая повышает экспрессию по меньшей мере одного полинуклеотида, который кодирует толерогенный фактор, по сравнению с немодифицированной клеткой; и по меньшей мере одной генетической модификации, которая изменяет экспрессию по меньшей мере одного гена, который кодирует фактор выживания, по сравнению с немодифицированной клеткой. В других вариантах осуществления для генетически модифицированных клеток предусмотрена по меньшей мере одна делеция или мутация типа "вставка-делеция" в пределах по меньшей мере одного гена, которая изменяет экспрессию одного или нескольких человеческих лейкоцитарных антигенов MHC-I и MHC-II по сравнению с немодифицированной клеткой, или рядом с ним; и по меньшей мере одна вставка полинуклеотида, который кодирует по меньшей мере один толерогенный фактор, по сайту, который частично перекрывается, полностью перекрывается с сайтом или содержится в сайте делеции гена, которая изменяет экспрессию одного или нескольких HLA MHC-I и MHC-II. В следующих вариантах осуществления генетически модифицированные клетки содержат по меньшей мере одну генетическую модификацию, которая обеспечивает изменение экспрессии по меньшей мере одного гена, который кодирует фактор выживания, по сравнению с немодифицированной клеткой.

Гены, которые кодируют главный комплекс гистосовместимости (MHC), располагаются на человеческой хромосоме 6p21. Полученные в результате белки, кодируемые генами MHC, представляют собой группу поверхностных белков, которые необходимы для донорской совместимости при трансплантации клеток. Гены MHC делятся на MHC класса I (MHC-I) и MHC класса II (MHC-II). Гены MHC-I (HLA-A, HLA-B и HLA-C) экспрессируются практически во всех типах клеток тканей, презентующих "не являющиеся своими" антигенпроцессированные пептиды CD8<sup>+</sup> Т-клеткам, тем самым способствуя их активации до цитолитической CD8<sup>+</sup> Т-клетки. Трансплантированные или привитые клетки, экспрессирующие "не являющиеся своими" молекулы MHC-I, будут вызывать устойчивый клеточный иммунный ответ, направленный на эти клетки и в конечном итоге приводящий к их гибели под действием активированных цитолитических CD8<sup>+</sup> Т-клеток. Белки MHC-I тесно связаны с бета-2-микроглобулином (B2M) в эндоплазматическом ретикулуме, что важно для образования функциональных молекул MHC-I на поверхности клетки. Кроме того, существуют три неклассифицированные молекулы MHC-Ib (HLA-E, HLA-F и HLA-G), которые обладают иммунорегуляторными функциями. Биологическая молекула MHC-II включает HLA-DP, HLA-DM, HLA-

DOA, HLA-DOB, HLA-DQ и HLA-DR. Благодаря своей основной функции в иммунном ответе биологические молекулы МНС-I и МНС-II способствуют иммунному отторжению после приживления клеточного трансплантата не принадлежащих реципиенту клеток, например, приживления клеточного трансплантата для целей регенеративной медицины.

Молекулы МНС-I на клеточной поверхности состоят из кодируемых МНС тяжелых цепей (HLA-A, HLA-B или HLA-C) и инвариантной субъединицы бета-2-микроглобулина (B2M). Таким образом, снижение концентрации B2M в клетке обеспечивает эффективный способ снижения экспрессии молекул МНС-I на клеточной поверхности.

В некоторых вариантах осуществления клетка содержит геномную модификацию одного или нескольких генов МНС-I или МНС-II. В некоторых вариантах осуществления клетка содержит геномную модификацию одной или нескольких полинуклеотидных последовательностей, которые регулируют экспрессию МНС-I и/или МНС-II. В некоторых вариантах осуществления генетическую модификацию по настоящему изобретению осуществляют с использованием любого способа редактирования генов, включающего без ограничения способы, описываемые в данном изобретении.

В некоторых вариантах осуществления снижения экспрессии одного или нескольких человеческих лейкоцитарных антигенов МНС-I и МНС-II по сравнению с немодифицированной клеткой достигают посредством нацеливания, например для генетической делеции и/или вставки по меньшей мере одной пары оснований, непосредственно на ген МНС-I и/или МНС-II. В некоторых вариантах осуществления снижения экспрессии одного или нескольких человеческих лейкоцитарных антигенов МНС-I и МНС-II по сравнению с немодифицированной клеткой достигают посредством нацеливания, например для генетической делеции, на ген СИТА. В некоторых вариантах осуществления снижения экспрессии одного или нескольких человеческих лейкоцитарных антигенов МНС-I и МНС-II по сравнению с немодифицированной клеткой достигают путем нацеливания, например для генетической делеции, по меньшей мере на один регулятор транскрипции МНС-I или МНС-II. В некоторых вариантах осуществления регулятор транскрипции МНС-I или МНС-II представляет собой ген NLRC5 или СИТА. В некоторых вариантах осуществления регулятор транскрипции МНС-I или МНС-II представляет собой ген RFX5, RFXAP, RFXANK, NFY-A, NFY-B, NFY-C, IRF-1 и/или TAP1.

В некоторых вариантах осуществления геном клетки был модифицирован с делецией всего или части гена HLA-A, HLA-B и/или HLA-C. В некоторых вариантах осуществления геном клетки был модифицирован с делецией всего или части промоторного участка гена HLA-A, HLA-B и/или HLA-C. В некоторых вариантах осуществления геном клетки был модифицирован с делецией всего или части гена, кодирующего регулятор транскрипции МНС-I или МНС-II. В некоторых вариантах осуществления геном клетки был модифицирован с делецией всего или части промоторного участка гена, кодирующего регулятор транскрипции МНС-I или МНС-II.

В некоторых вариантах осуществления геном клетки был модифицирован со снижением экспрессии бета-2-микроглобулина (B2M). B2M представляет собой неполиморфный ген, который кодирует общую белковую субъединицу, необходимую для поверхностной экспрессии всех тяжелых цепей полиморфного МНС класса I. Белки МНС-I тесно связаны с B2M в эндоплазматическом ретикулуме, что важно для образования функциональных молекул HLA-I на поверхности клетки. В некоторых вариантах осуществления gRNA нацеливается на сайт в гене B2M, содержащий последовательность 5'-GCTACTCTCTTTCTGGCC-3' (SEQ ID NO: 1). В некоторых вариантах осуществления gRNA нацеливается на сайт в гене B2M, содержащий последовательность 5'-GGCCGAGATGTCTCGCTCCG-3' (SEQ ID NO: 2). В некоторых вариантах осуществления gRNA нацеливается на сайт в гене B2M, содержащий последовательность 5'-CGCGAGCACAGCTAAGGCCA-3' (SEQ ID NO: 3). В альтернативных вариантах осуществления gRNA нацеливается на сайт в гене B2M, содержащий любую из следующих последовательностей: 5'-TATAAGTGGAGGCGTTCGCGC-3' (SEQ ID NO: 35), 5'-GAGTAGCGGAGCACAGCTA-3' (SEQ ID NO: 36), 5'-ACTGGACGCGTTCGCGCTGGC-3' (SEQ ID NO: 37), 5'-AAGTGGAGGCGTTCGCGCTGG-3' (SEQ ID NO: 38), 5'-GGCCACGGAGCGAGACATCT-3' (SEQ ID NO: 39), 5'-GCCCGAATGCTGTTCAGCTTC-3' (SEQ ID NO: 40), 5'-CTCGCGTACTCTCTTTCT-3' (SEQ ID NO: 41), 5'-TCCTGAAGCTGACAGCATTC-3' (SEQ ID NO: 42), 5'-TTCCTGAAGCTGACAGCATTC-3' (SEQ ID NO: 43) или 5'-ACTCTCTTTCTGGCCTGG-3' (SEQ ID NO: 44). В некоторых вариантах осуществления gRNA содержит полинуклеотидную последовательность под любым из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43 или SEQ ID NO: 44. Комплекс gRNA/CRISPR-нуклеаза нацеливается на целевой сайт и расщепляет его в локусе B2M. Репарация двухнитевого разрыва посредством NHEJ может приводить к делеции по меньшей мере одного нуклеотида и/или к вставке по меньшей мере одного нуклеотида, с обеспечением таким образом нарушения или устранения экспрессии B2M. В качестве альтернативы на locus B2M могут быть нацелены по меньшей мере две системы CRISPR, каждая из которых содержит разную gRNA, поэтому расщепление по двум сайтам в локусе B2M приводит к делеции последовательности между двумя разрезами, с устранением тем самым экспрессии B2M.

В некоторых вариантах осуществления геном клетки был модифицирован для снижения экспрессии тиоредоксин-взаимодействующего белка (TXNIP). В некоторых вариантах осуществления gRNA

нацеливается на сайт в гене TXNIP, содержащем последовательность 5'-GAAGCGTGTCTTCATAGCGC-3' (SEQ ID NO: 15). В некоторых вариантах осуществления gRNA нацеливается на сайт в гене TXNIP, содержащем последовательность 5'-ТТАСТСГТГТСААГССГТТ-3' (SEQ ID NO: 16). В некоторых вариантах осуществления gRNA нацеливается на сайт в гене TXNIP, содержащем последовательность 5'-TGТСААГССГТТАГГАТСС-3' (SEQ ID NO: 17). В некоторых вариантах осуществления gRNA нацеливается на сайт в гене TXNIP, содержащем последовательность 5'-GCCGТТАГГАТССТGGCTTG-3' (SEQ ID NO: 18). В некоторых вариантах осуществления gRNA нацеливается на сайт в гене TXNIP, содержащем последовательность 5'-GCGGAGTGGCTAAAGTGCTT-3' (SEQ ID NO: 19). В некоторых вариантах осуществления gRNA нацеливается на сайт в гене TXNIP, содержащем последовательность 5'-TCCGСААГССАГГАТССТАА-3' (SEQ ID NO: 20). В некоторых вариантах осуществления gRNA нацеливается на сайт в гене TXNIP, содержащем последовательность 5'-GTTCGGCTTTGAGCTTCCTC-3' (SEQ ID NO: 21). В некоторых вариантах осуществления gRNA нацеливается на сайт в гене TXNIP, содержащем последовательность 5'-GAGATGGTGATCATGAGACC-3' (SEQ ID NO: 22). В некоторых вариантах осуществления gRNA нацеливается на сайт в гене TXNIP, содержащем последовательность 5'-TTGТАСТСАТАТТТGTTTCC-3' (SEQ ID NO: 23). В некоторых вариантах осуществления gRNA нацеливается на сайт в гене TXNIP, содержащем последовательность 5'-ААСААТАТGAGТАСААГТТ-3' (SEQ ID NO: 24). В некоторых вариантах осуществления gRNA нацеливается на сайт в гене TXNIP, содержащем последовательность 5'-GAAGCGTGTCTTCATAGCGCAGG-3' (SEQ ID NO: 45). В некоторых вариантах осуществления gRNA нацеливается на сайт в гене TXNIP, содержащем последовательность 5'-ТТАСТСГТГТСААГССГТТАГГ-3' (SEQ ID NO: 46). В некоторых вариантах осуществления gRNA нацеливается на сайт в гене TXNIP, содержащем последовательность 5'-TGТСААГССГТТАГГАТССТGG-3' (SEQ ID NO: 47). В некоторых вариантах осуществления gRNA нацеливается на сайт в гене TXNIP, содержащем последовательность 5'-GCCGТТАГГАТССТGGCTTGCGG-3' (SEQ ID NO: 48). В некоторых вариантах осуществления gRNA нацеливается на сайт в гене TXNIP, содержащем последовательность 5'-GCGGAGTGGCTAAAGTGCTTTGG-3' (SEQ ID NO: 49). В некоторых вариантах осуществления gRNA нацеливается на сайт в гене TXNIP, содержащем последовательность 5'-TCCGСААГССАГГАТССТААССГГ-3' (SEQ ID NO: 50). В некоторых вариантах осуществления gRNA нацеливается на сайт в гене TXNIP, содержащем последовательность 5'-GTTCGGCTTTGAGCTTCCTCAGG-3' (SEQ ID NO: 51). В некоторых вариантах осуществления gRNA нацеливается на сайт в гене TXNIP, содержащем последовательность 5'-GAGATGGTGATCATGAGACCTGG-3' (SEQ ID NO: 52). В некоторых вариантах осуществления gRNA нацеливается на сайт в гене TXNIP, содержащем последовательность 5'-TTGТАСТСАТАТТТGTTTCCAGG-3' (SEQ ID NO: 53). В некоторых вариантах осуществления gRNA нацеливается на сайт в гене TXNIP, содержащем последовательность 5'-ААСААТАТGAGТАСААГТТССГГ-3' (SEQ ID NO: 54). В некоторых вариантах осуществления gRNA нацеливается на целевой сайт в гене TXNIP, который содержит полинуклеотидную последовательность под любым из SEQ ID NO: 15-24 или 45-54. В некоторых вариантах осуществления gRNA нацеливается на полинуклеотидную последовательность под любым из SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23 или SEQ ID NO: 24. Комплекс gRNA/CRISPR-нуклеаза нацеливается на целевой сайт и расщепляет его в локусе гена TXNIP. Репарация двухнитевого разрыва посредством NHEJ может приводить к делеции по меньшей мере одного нуклеотида и/или к вставке по меньшей мере одного нуклеотида, с обеспечением таким образом нарушения или устранения экспрессии TXNIP. Альтернативно, вставка полинуклеотида, кодирующего экзогенный ген, в локус гена TXNIP, может нарушить или устранить экспрессию TXNIP.

В некоторых вариантах осуществления геном клетки был модифицирован со снижением экспрессии транскриптора класса II (СІТА). СІТА является представителем семейства LR или белков с нуклеотидсвязывающим доменом (NBD) и повтором, богатым лейцином (LRR), и регулирует транскрипцию МНС-II, связываясь с энхансомой МНС. Экспрессия СІТА индуцируется в В-клетках и дендритных клетках в зависимости от стадии развития и индуцируется IFN-γ в большинстве типов клеток.

В некоторых вариантах осуществления геном клетки был модифицирован со снижением экспрессии семейства NLR, содержащего домен CARD белка 5 (NLRC5). NLRC5 является важным регулятором МНС-I-опосредованных иммунных ответов, и аналогично СІТА NLRC5 в высокой степени индуцируется посредством IFN-γ, а также может перемещаться в ядро. NLRC5 активирует промоторы генов МНС-I и индуцирует транскрипцию МНС-I, а также родственных генов, вовлеченных в презентацию антигена МНС-I.

В некоторых вариантах осуществления толерогенные факторы могут быть вставлены или повторно вставлены в генетически модифицированные клетки для создания иммунологически привилегированных универсальных донорских клеток. В некоторых вариантах осуществления универсальные донорские клетки, раскрываемые в данном изобретении, были дополнительно модифицированы для экспрессии одного или нескольких толерогенных факторов. Иллюстративные толерогенные факторы включают без ограничения один или несколько из HLA-C, HLA-E, HLA-F, HLA-G, PD-L1, CTLA-4-Ig, CD47,

СИ-ингибитора и IL-35. В некоторых вариантах осуществления генетическая модификация, например, вставка, по меньшей мере одного полинуклеотида, кодирующего по меньшей мере один толерогенный фактор, позволяет универсальной донорской клетке подавлять иммунное отторжение или ускользать от иммунного отторжения с показателями, в по меньшей мере 1,05, по меньшей мере 1,1, по меньшей мере 1,25, по меньшей мере 1,5, по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 10, по меньшей мере 20 или по меньшей мере 50 раз превышающими такие показатели у немодифицированной клетки после приживления трансплантата. В некоторых вариантах осуществления вставка полинуклеотида, который кодирует HLA-E, HLA-G, CTLA-4, CD47 и/или PD-L1, позволяет универсальной донорской клетке, подавлять иммунное отторжение или ускользать от иммунного отторжения после трансплантации или приживления трансплантата у субъекта-хозяина.

Полинуклеотид, кодирующий толерогенный фактор, как правило, содержит левое и правое плечи гомологии, которые фланкируют последовательность, кодирующую толерогенный фактор. Плечи гомологии характеризуются значительной степенью гомологии последовательностей с геномной ДНК по целевому сайту вставки или рядом с ним. Например, левое плечо гомологии может быть нуклеотидной последовательностью, гомологичной участку, расположенному слева от или выше целевого сайта или сайта разреза, а правое плечо гомологии может быть нуклеотидной последовательностью, гомологичной участку, расположенному справа от или ниже целевого сайта или сайта разреза. Проксимальный конец каждого плеча гомологии может быть гомологичным последовательности геномной ДНК, прилегающей к сайту разреза. В качестве альтернативы проксимальный конец каждого плеча гомологии может быть гомологичным последовательности геномной ДНК, расположенной на расстоянии до приблизительно 10, 20, 30, 40, 50, 60 или 70 нуклеотидных оснований от сайта разреза. Таким образом, полинуклеотид, кодирующий толерогенный фактор, может быть вставлен в целевой локус гена в пределах приблизительно 10, 20, 30, 40, 50, 60 или 70 пар оснований от сайта разреза, а дополнительная геномная ДНК, граничащая с сайтом разреза (и не имеющая гомологии с плечом гомологии), может быть удалена. Длина плеч гомологии может находиться в диапазоне от приблизительно 50 нуклеотидов до нескольких тысяч нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления длина плеч гомологии может находиться в диапазоне от приблизительно 500 нуклеотидов до приблизительно 1000 нуклеотидов. Значительная гомология последовательностей между плечами гомологии и геномной ДНК может составлять по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 85%, по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 95% или по меньшей мере приблизительно 99%.

В некоторых вариантах осуществления плечи гомологии используют с нуклеиновыми кислотами, направляющими к B2M (например, gRNA, содержащими нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 1-3, 35-44). В некоторых вариантах осуществления плечи гомологии разработаны таким образом, чтобы их можно было использовать с любой нуклеиновой кислотой, направляющей к B2M, которая может обеспечивать устранение сайта инициации гена B2M. В некоторых вариантах осуществления плечи гомологии для B2M могут содержать полинуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 7 или 13 или полинуклеотидную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 85, 90, 95 или 99% идентичностью последовательности с последовательностью под SEQ ID NO: 7 или 13, или состоять по сути из них. В некоторых вариантах осуществления левое плечо гомологии для B2M может содержать SEQ ID NO: 7 или полинуклеотидную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 85, 90, 95 или 99% идентичностью последовательности с последовательностью под SEQ ID NO: 7, или состоять по сути из нее. В некоторых вариантах осуществления правое плечо гомологии для B2M может содержать SEQ ID NO: 13 или полинуклеотидную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 85, 90, 95 или 99% идентичностью последовательности с последовательностью под SEQ ID NO: 13, или состоять по сути из нее.

В некоторых вариантах осуществления плечи гомологии используют с нуклеиновыми кислотами, направляющими к TXNIP (например, gRNA, содержащими нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 15-24). В некоторых вариантах осуществления плечи гомологии разработаны таким образом, чтобы их можно было использовать с любой нуклеиновой кислотой, направляющей к TXNIP, которая нацелена на экзон 1 TXNIP (например, gRNA, содержащими нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 15-20). В некоторых вариантах осуществления плечи гомологии для TXNIP могут содержать полинуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 25 или 32 или полинуклеотидную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 85, 90, 95 или 99% идентичностью последовательности с последовательностью под SEQ ID NO: 25 или 32, или состоять по сути из них. В некоторых вариантах осуществления левое плечо гомологии для TXNIP может содержать SEQ ID NO: 25 или полинуклеотидную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 85, 90, 95 или 99% идентичностью последовательности с последовательностью под SEQ ID NO: 25, или состоять по сути из нее. В некоторых вариантах осуществления правое плечо гомологии для TXNIP может содержать SEQ ID NO: 32 или полинуклеотидную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 85, 90, 95 или 99% идентичностью последовательности с последовательностью под SEQ ID NO: 32, или состоять по сути из нее.

По меньшей мере один полинуклеотид, кодирующий по меньшей мере один толерогенный фактор,

может быть функционально связан с экзогенным промотором. Экзогенный промотор может быть конститутивным, индуцируемым, времяспецифическим, тканеспецифическим или клеточноспецифическим промотором. В некоторых вариантах осуществления экзогенный промотор представляет собой промотор CMV, EF1a, PGK, CAG или UBC.

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один полинуклеотид, кодирующий по меньшей мере один толерогенный фактор, вставляют в локус типа "safe harbor", например локус AAVS 1. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один полинуклеотид, кодирующий по меньшей мере один толерогенный фактор, вставляют по сайту или в участок геномной ДНК, который частично перекрывается, полностью перекрывается или содержится в (т.е. находится в пределах гена или рядом с ним) гене MHC-I, гене MHC-II или регуляторе транскрипции MHC-I или MHC-II.

В некоторых вариантах осуществления вставку полинуклеотида, кодирующего PD-L1, осуществляют по сайту в пределах локуса гена B2M или рядом с ним. В некоторых вариантах осуществления вставку полинуклеотида, кодирующего PD-L1, осуществляют по сайту в пределах локуса гена B2M или рядом с ним одновременно с делецией всего или части гена или промотора B2M или после нее. Полинуклеотид, кодирующий PD-L1, функционально связан с экзогенным промотором. Экзогенный промотор может быть промотором CMV. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид содержит нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 11.

В некоторых вариантах осуществления вставку полинуклеотида, кодирующего HLA-E, осуществляют по сайту в пределах локуса гена B2M или рядом с ним. В некоторых вариантах осуществления вставку полинуклеотида, кодирующего HLA-E, осуществляют по сайту в пределах локуса гена B2M или рядом с ним одновременно с делецией всего или части гена или промотора B2M или после нее. Полинуклеотид, кодирующий HLA-E, функционально связан с экзогенным промотором. Экзогенный промотор может быть промотором CMV. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид содержит нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 26, 27, 28, 29, 30 и/или 30. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид содержит нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 55.

В некоторых вариантах осуществления вставку полинуклеотида, кодирующего HLA-G, осуществляют по сайту в пределах локуса гена HLA-A, HLA-B или HLA-C или рядом с ним. В некоторых вариантах осуществления вставку полинуклеотида, кодирующего HLA-G, осуществляют по сайту в пределах локуса гена HLA-A, HLA-B или HLA-C или рядом с ним одновременно с делецией гена или промотора HLA-A, HLA-B или HLA-C или после нее.

В некоторых вариантах осуществления вставку полинуклеотида, кодирующего CD47, осуществляют по сайту в пределах локуса гена СИТА или рядом с ним. В некоторых вариантах осуществления вставку полинуклеотида, кодирующего CD47, осуществляют по сайту в пределах локуса гена СИТА или рядом с ним одновременно с делецией гена или промотора СИТА или после нее.

В некоторых вариантах осуществления вставку полинуклеотида, кодирующего HLA-G, осуществляют по сайту в пределах локуса гена HLA-A, HLA-B или HLA-C или рядом с ним одновременно со вставкой полинуклеотида, кодирующего CD47, по сайту в пределах гена локуса СИТА или рядом с ним.

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один полинуклеотид, кодирующий по меньшей мере один толерогенный фактор, может доставляться в клетки в составе вектора. Например, вектор может быть плазмидным вектором. В различных вариантах осуществления количество плазмидного вектора, доставляемого в клетки, может находиться в диапазоне от приблизительно 0,5 мкг до приблизительно 10 мкг (на приблизительно  $10^6$  клеток). В некоторых вариантах осуществления количество плазмиды может находиться в диапазоне от приблизительно 1 мкг до приблизительно 8 мкг, от приблизительно 2 мкг до приблизительно 6 мкг или от приблизительно 3 мкг до приблизительно 5 мкг. В конкретных вариантах осуществления количество плазмиды, доставляемой в клетки, может составлять приблизительно 4 мкг.

В некоторых вариантах осуществления клетка характеризуется повышенной или пониженной экспрессией одного или нескольких факторов выживания. В некоторых вариантах осуществления клетка содержит вставку из одной или нескольких полинуклеотидных последовательностей, которые кодируют фактор выживания. В некоторых вариантах осуществления клетка содержит делецию одного или нескольких факторов выживания. В некоторых вариантах осуществления генетическую модификацию по настоящему изобретению осуществляют с использованием любого способа редактирования генов, включающего без ограничения способы, описываемые в данном изобретении. В некоторых вариантах осуществления клетка характеризуется повышенной или пониженной экспрессией по меньшей мере одного фактора выживания по сравнению с немодифицированной клеткой. В некоторых вариантах осуществления фактор выживания является представителем или важным путем, вовлеченным в выживаемость клетки, например, гипоксией, активными формами кислорода, депривацией питательных веществ и/или окислительным стрессом. В некоторых вариантах осуществления генетическая модификация по меньшей мере одного фактора выживания обеспечивает выживание универсальной донорской клетки на протяжении более длительного периода времени, например, на протяжении в по

меньшей мере 1,05, по меньшей мере 1,1, по меньшей мере 1,25, по меньшей мере 1,5, по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 10, по меньшей мере 20 или по меньшей мере 50 раз более длительного периода времени, чем у немодифицированной клетки после приживления трансплантата. В некоторых вариантах осуществления фактор выживания представляет собой ZNF143, TXNIP, FOXO1, JNK или MANF.

В некоторых вариантах осуществления вставка в клетку полинуклеотида, который кодирует MANF, позволяет универсальной донорской клетке выживать после трансплантации или приживления трансплантата в субъекте-хозяине при более высоких показателях выживаемости по сравнению с немодифицированной клеткой. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид, который кодирует MANF, вставляют в локус типа "safe harbor". В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид, который кодирует MANF, вставляют в ген, относящийся к MHC-I, MHC-II или регулятору транскрипции MHC-I или MHC-II.

В некоторых вариантах осуществления геном клетки был модифицирован с делецией всего или части гена ZNF143, TXNIP, FOXO1 и/или JNK. В некоторых вариантах осуществления геном клетки был модифицирован с делецией всего или части промоторного участка гена ZNF143, TXNIP, FOXO1 и/или JNK.

В некоторых вариантах осуществления более одного фактора выживания генетически модифицированы в клетке.

В определенных вариантах осуществления клетки, характеризующиеся отсутствием экспрессии MHC-II и умеренной экспрессией MHC-I, являются генетически модифицированными с отсутствием поверхностной экспрессии MHC-I или MHC-II. В другом варианте осуществления клетки с отсутствием поверхностной экспрессии MHC-I/II дополнительно редактируют с наличием экспрессии PD-L1, например, вставки полинуклеотида, кодирующего PD-L1. В еще одном варианте осуществления клетки с отсутствием поверхностной экспрессии MHC-I/II дополнительно редактируют с наличием экспрессии PD-L1, например вставки полинуклеотида, кодирующего PD-L1, а также являются генетически модифицированными с повышением или снижением экспрессии по меньшей мере одного гена, который кодирует фактор выживания, по сравнению с немодифицированной клеткой.

В некоторых вариантах осуществления клетки дополнительно характеризуются повышенной или пониженной экспрессией, например за счет генетической модификации, одного или нескольких дополнительных генов, которые не обязательно участвуют либо в ускользании от иммунного надзора, либо в выживании клеток после приживления трансплантата. В некоторых вариантах осуществления клетки дополнительно характеризуются повышенной или пониженной экспрессией одного или нескольких белков-переключателей безопасности по сравнению с немодифицированной клеткой. В некоторых вариантах осуществления клетки характеризуются повышенной экспрессией одного или нескольких дополнительных генов, которые кодируют белок-переключатель безопасности. В некоторых вариантах осуществления переключатель безопасности также представляет собой суицидальный ген. В некоторых вариантах осуществления переключатель безопасности представляет собой тимидинкиназу вируса простого герпеса-1 (HSV-tk) или индуцируемую каспазу-9. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид, который кодирует по меньшей мере один переключатель безопасности, вставляют в геном, например в локус типа "safe harbor". В некоторых других вариантах осуществления один или несколько дополнительных генов, которые генетически модифицированы, кодируют один или несколько белков-переключателей безопасности; нацеливающих средств; рецепторов; сигнальных молекул; факторов транскрипции; фармацевтически активных белков или пептидов; целевых кандидатов для лекарственных средств и белков, способствующих их приживлению трансплантата, направленной миграции, хомингу, жизнеспособности, самообновлению, устойчивости и/или выживанию, интегрированных с конструкцией.

В одном аспекте настоящего изобретения представлен способ получения универсальных донорских клеток со сконструированным геномом, при этом универсальная донорская клетка содержит по меньшей мере одну целевую геномную модификацию в одном или нескольких выбранных сайтах в геноме, при этом способ включает осуществление генетического конструирования типа клетки, как описано в данном изобретении, путем введения в указанные клетки одной или нескольких конструкций, обеспечивающих целевую модификацию в выбранном сайте; введение в указанные клетки одного или нескольких двухнитевых разрывов в выбранных сайтах с использованием одной или нескольких эндонуклеаз, способных распознавать выбранный сайт; и культивирование редактируемых клеток для обеспечения эндогенной репарации ДНК с созданием целевых вставок или делеций в выбранных сайтах; с получением тем самым универсальных донорских клеток с модифицированным геномом. Универсальные донорские клетки с модифицированным геномом могут подвергаться последовательным циклам модификации генома, так что нацеливание и модификацию осуществляют в отношении нескольких сайтов. Клетки с модифицированным геномом культивируют, характеризуют, отбирают и размножают с использованием методов, хорошо известных в данной области техники. Универсальные донорские клетки, полученные посредством данного способа, будут содержать по меньшей мере одну функциональную целевую геномную модификацию, и при этом клетки с модифицированным геномом,

если они являются стволовыми клетками, в дальнейшем способны дифференцироваться в клетки-предшественники или полностью дифференцированные клетки.

В некоторых других вариантах осуществления универсальные донорские клетки со сконструированным геномом характеризуются введенной или повышенной экспрессией по меньшей мере одного из HLA-E, HLA-G, CD47 или PD-L1. В некоторых вариантах осуществления универсальные донорские клетки со сконструированным геномом являются дефектными по HLA класса I и/или класса II. В некотором варианте осуществления универсальные донорские клетки со сконструированным геномом содержат нулевой B2M или B2M с низкой активностью. В некоторых вариантах осуществления универсальные донорские клетки со сконструированным геномом содержат интегрированный или неинтегрированный экзогенный полинуклеотид, кодирующий один или несколько белков HLA-E, HLA-G и PD-L1. В некоторых вариантах осуществления указанная введенная экспрессия является повышенной экспрессией либо неэкспрессируемых, либо слабо экспрессируемых генов, содержащихся в указанных клетках. В некоторых вариантах осуществления неинтегрированные экзогенные полинуклеотиды вводят с использованием вируса Сендай, AAV, эписомы или плазмиды. В некотором варианте осуществления универсальные донорские клетки являются нулевыми по B2M с введенной экспрессией одного или нескольких из HLA-E, HLA-G, PD-L1 и повышенной или пониженной экспрессией по меньшей мере одного белка-переключателя безопасности. В другом варианте осуществления универсальные донорские клетки являются нулевыми по HLA-A, HLA-B и HLA-C с введенной экспрессией одного или нескольких из HLA-E, HLA-G, PD-L1 и по меньшей мере одного белка-переключателя безопасности. В некотором варианте осуществления универсальные донорские клетки являются нулевыми по B2M с введенной экспрессией одного или нескольких из HLA-E, HLA-G, PD-L1 и повышенной или пониженной экспрессией по меньшей мере одного фактора выживания, например MANF. Предполагается, что способы получения любых из рассматриваемых в данном изобретении генетически модифицированных клеток будут выполняться с использованием по меньшей мере любого из описываемых в данном изобретении способов редактирования генов.

#### IV. Типы клеток.

Клетки, описываемые в данном изобретении, например универсальные донорские клетки (и соответствующие немодифицированные клетки), могут принадлежать к любому существующему классу клеточного типа. В некоторых вариантах осуществления клетка, например универсальная донорская клетка (и соответствующая немодифицированная клетка), может быть клеткой млекопитающего. В некоторых вариантах осуществления клетка, например универсальная донорская клетка (и соответствующая немодифицированная клетка), может быть человеческой клеткой. В некоторых вариантах осуществления клетка, например универсальная донорская клетка (и соответствующая немодифицированная клетка), может быть стволовой клеткой. В некоторых вариантах осуществления клетка, например универсальная донорская клетка (и соответствующая немодифицированная клетка), может быть плюрипотентной стволовой клеткой (PSC). В некоторых вариантах осуществления клетка, например универсальная донорская клетка (и соответствующая немодифицированная клетка), может представлять собой эмбриональную стволовую клетку (ESC), стволовую клетку взрослого организма (ASC), индуцированную плюрипотентную стволовую клетку (iPSC) или гемопоэтическую стволовую клетку или клетку-предшественника (HSPC) (также называемую гемопоэтической стволовой клеткой (HSC)). В некоторых вариантах осуществления клетка, например универсальная донорская клетка (и соответствующая немодифицированная клетка), может быть дифференцированной клеткой. В некоторых вариантах осуществления клетка, например универсальная донорская клетка (и соответствующая немодифицированная клетка), может быть соматической клеткой, например клеткой иммунной системы или сократительной клеткой, например клеткой скелетных мышц.

Клетки, например универсальные донорские стволовые клетки, описываемые в данном изобретении, могут быть дифференцированы в соответствующие типы клеток для оценки экспрессии HLA, а также для оценки иммуногенности линий универсальных стволовых клеток. В целом дифференцировка включает поддержание клеток, представляющих интерес, на протяжении периода времени и в условиях, достаточных для того, чтобы клетки дифференцировались в дифференцированные клетки, представляющие интерес. Например, универсальные стволовые клетки, раскрытые в данном изобретении, могут быть дифференцированы в мезенхимальные клетки-предшественники (MPC), гипоиimmunогенные кардиомиоциты, мышечные клетки-предшественники, бластные клетки, эндотелиальные клетки (EC), макрофаги, гепатоциты, бета-клетки (например, бета-клетки поджелудочной железы), предшественники энтодермальной части поджелудочной железы, предшественники эндокринной части поджелудочной железы, гемопоэтические клетки-предшественники или нервные клетки-предшественники (NPC). В некоторых вариантах осуществления универсальные донорские клетки могут быть дифференцированы в клетки дефинитивной энтодермы, клетки первичной кишечной трубки, клетки задней части передней кишки, энтодермальные клетки поджелудочной железы (PEC), эндокринные клетки поджелудочной железы, незрелые бета-клетки или созревающие бета-клетки.

Стволовые клетки способны как пролиферировать, так и давать начало дополнительным клеткам-

предшественникам, которые, в свою очередь, обладают способностью создавать большое количество материнских клеток, которые, в свою очередь, могут давать начало дифференцированным или дифференцируемым дочерним клеткам. Дочерние клетки сами по себе можно индуцировать к пролиферации и образованию потомства, которое впоследствии дифференцируется в один или несколько типов зрелых клеток, при этом также сохраняется одна или несколько клеток с родительским потенциалом дифференцировки. В таком случае термин "стволовая клетка" относится к клетке, при определенных обстоятельствах обладающей способностью или потенциалом дифференцироваться в более специализированный или дифференцированный фенотип, и при определенных обстоятельствах также сохраняющую способность к пролиферации без существенной дифференцировки. В одном аспекте термин "клетка-предшественник" или "стволовая клетка" относится к генерализованной материнской клетке, потомки (потомство) которой специализируются, зачастую в разных направлениях, за счет дифференцировки, например, за счет приобретения полностью индивидуальных признаков, как это происходит при прогрессирующей дифференцировке эмбриональных клеток и тканей. Клеточная дифференцировка представляет собой сложный процесс, как правило, происходящий на протяжении множества клеточных делений. Дифференцированная клетка может происходить от мультипотентной клетки, которая сама происходит от мультипотентной клетки и т.д. Хотя каждая из этих мультипотентных клеток может считаться стволовой клеткой, диапазон типов клеток, которым может давать начало каждая из них, может значительно отличаться. Некоторые дифференцированные клетки также способны давать начало клеткам с большим потенциалом дифференцировки. Такая способность может быть естественной или может быть индуцирована искусственно путем обработки различными факторами. Во многих биологических ситуациях стволовые клетки также могут быть "мультипотентными", поскольку они могут давать потомство, относящееся более чем к одному отдельному типу клеток, но это не является необходимым условием для определения клетки как "стволовой".

"Дифференцированная клетка" представляет собой клетку, которая продвинулась дальше по пути дифференцировки, чем клетка, с которой ее сравнивают. Таким образом, стволовые клетки могут дифференцироваться в линиеспецифические клетки-предшественники (такие как клетка-предшественник миоцитов), которые, в свою очередь, могут дифференцироваться в другие типы клеток-предшественников, находящиеся дальше на пути дифференцировки (такие как предшественник миоцитов), а затем в полностью дифференцированную клетку, такую как миоцит, который выполняет собственную роль в определенном типе ткани и может сохранять или не сохранять способность к дальнейшей пролиферации. В некоторых вариантах осуществления дифференцированная клетка может быть бета-клеткой поджелудочной железы.

Эмбриональные стволовые клетки.

Клетки, описываемые в данном изобретении, могут быть эмбриональными стволовыми клетками (ESC). ESC происходят из бластоцитов эмбрионов млекопитающих, способны дифференцироваться в любой тип клеток и быстро размножаться. Также полагают, что ESC характеризуются нормальным кариотипом, поддерживающим высокую теломеразную активность и демонстрирующим исключительный длительный пролиферативный потенциал, что делает эти клетки отличными кандидатами для применения в качестве универсальных донорских клеток.

Стволовые клетки взрослого организма.

Клетки, описываемые в данном изобретении, могут быть стволовыми клетками взрослого организма (ASC). ASC являются недифференцированными клетками, которые могут быть найдены у млекопитающих, например людей. ASC определяют по их способности к самообновлению, например, проходить через несколько циклов репликации клеток, сохраняя при этом свое недифференцированное состояние, и по способности дифференцироваться в несколько различных типов клеток, например в глиальные клетки. Стволовые клетки взрослого организма представляют собой широкий класс стволовых клеток, который может охватывать гемопоэтические стволовые клетки, стволовые клетки молочной железы, стволовые клетки кишечника, мезенхимальные стволовые клетки, эндотелиальные стволовые клетки, нервные стволовые клетки, обонятельные стволовые клетки взрослого организма, стволовые клетки нервного гребня и клетки яичек.

Индукцированные плюрипотентные стволовые клетки.

Клетки, описываемые в данном изобретении, могут быть индуцированными плюрипотентными стволовыми клетками (iPSC). iPSC могут быть получены непосредственно из клетки взрослого человека путем введения генов, которые кодируют критические факторы транскрипции, вовлеченные в установление плюрипотентности, например OCT4, SOX2, cMYC и KLF4. iPSC могут быть получены от того же субъекта, которому следует вводить последующие клетки-предшественники. То есть соматическая клетка может быть получена от субъекта, перепрограммирована в индуцированную плюрипотентную стволовую клетку, а затем повторно дифференцирована в клетку-предшественника для введения субъекту (например, аутологичные клетки). Однако в случае аутологичных клеток сохраняется риск иммунного ответа и плохой жизнеспособности после приживления трансплантата.

Человеческие гемопоэтические стволовые клетки и клетки-предшественники.

Клетки, описываемые в данном изобретении, могут быть человеческими гемопоэтическими стволовыми клетками и клетками-предшественниками (hHSPC). Эти стволовые клетки дают начало всем типам клеток крови, включая эритроидные (эритроциты или красные кровяные клетки (RBC)), миелоидные (моноциты и макрофаги, нейтрофилы, базофилы, эозинофилы, мегакарициты/тромбоциты и дендритные клетки) и лимфоидные (Т-клетки, В-клетки, NK-клетки). Клетки крови продуцируются путем пролиферации и дифференцировки очень небольшой популяции плюрипотентных гемопоэтических стволовых клеток (HSC), которые также обладают способностью восстанавливать себя путем самообновления. В ходе дифференцировки потомство HSC проходит различные промежуточные стадии созревания с образованием полифункциональных и коммитированных по линиям клеток-предшественников до достижения зрелости. Костный мозг (BM) является основным участком кроветворения у людей, и в нормальных условиях в периферической крови (PB) можно обнаружить лишь небольшое количество гемопоэтических стволовых клеток и клеток-предшественников (HSPC). Лечение цитокинами, некоторыми миелосупрессивными лекарственными средствами, используемыми в лечении рака, и соединениями, которые нарушают взаимодействие между гемопоэтическими и стромальными клетками BM, может быстро мобилизовать большое количество стволовых клеток и предшественников в кровотоки.

Дифференцировка клеток в другие типы клеток.

Другая стадия способов по настоящему изобретению может предусматривать дифференцировку клеток в дифференцированные клетки. Стадия дифференцировки может осуществляться любым способом, известным в данной области техники. Например, дифференцировку человеческих iPSC в дефинитивную энтодерму осуществляют путем использования различных средств обработки, в том числе активина и добавки B27 (Life Technologies). Далее дефинитивную энтодерму дифференцируют в гепатоциты, при этом обработка предусматривает применение FGF4, HGF, BMP2, BMP4, онкостатина M, дексаметазона и т.д. (Duan et al., Stem Cells, 2010, 28:674-686; Ma et al., Stem Cells Translational Medicine, 2013, 2:409-419). В другом варианте осуществления стадия дифференцировки может быть выполнена согласно Sawitza et al., Sci Rep., 2015, 5:13320. Дифференцированная клетка может быть любой соматической клеткой млекопитающего, например человека. В некоторых вариантах осуществления соматическая клетка может представлять собой экзокринную секреторную эпителиальную клетку (например, слизистую клетку слюнной железы, клетку предстательной железы), секретирующую гормон клетку (например, клетку передней доли гипофиза, клетку кишечного тракта, островковую клетку поджелудочной железы), кератинизирующую эпителиальную клетку (например, эпидермальный кератиноцит), клетку влажного стратифицированного барьерного эпителия, передающую сигнал клетку (например, фоторецептор), вегетативные нервные клетки, поддерживающую клетку органа чувств и периферического нейрона (например, шванновскую клетку), нейрон центральной нервной системы, глиальную клетку (например, астроцит, олигодендроцит), клетку хрусталика, адипоцит, клетку почки, обеспечивающую барьерную функцию клетку (например, протоковую клетку), клетку внеклеточного матрикса, сократительную клетку (например, клетку скелетной мускулатуры, клетку сердечной мускулатуры, клетку гладкой мускулатуры), клетку крови (например, эритроцит), клетку иммунной системы (например, мегакариоцит, микроглиальную клетку, нейтрофил, тучную клетку, Т-клетку, В-клетку, естественную клетку-киллера), половую клетку (например, сперматиду), питающую клетку или интерстициальную клетку.

Как правило, популяции универсальных донорских клеток, описанные в данном изобретении, сохраняют экспрессию вставленной одной или нескольких нуклеотидных последовательностей с течением времени. Например, по меньшей мере приблизительно 50%, по меньшей мере приблизительно 55%, по меньшей мере приблизительно 60%, по меньшей мере приблизительно 65%, по меньшей мере приблизительно 70%, по меньшей мере приблизительно 75%, по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 85%, по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 95% или по меньшей мере приблизительно 99% универсальных донорских клеток экспрессируют один или несколько толерогенных факторов. Более того, популяции линиеспецифических или полностью дифференцированных клеток, полученных из раскрытых в данном изобретении универсальных донорских клеток, сохраняют экспрессию вставленной одной или нескольких нуклеотидных последовательностей с течением времени. Например, по меньшей мере приблизительно 50%, по меньшей мере приблизительно 55%, по меньшей мере приблизительно 60%, по меньшей мере приблизительно 65%, по меньшей мере приблизительно 70%, по меньшей мере приблизительно 75%, по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 85%, по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 95% или по меньшей мере приблизительно 99% линиеспецифических или полностью дифференцированных клеток экспрессируют один или несколько толерогенных факторов.

V. Составы и введения.

Состав и доставка для редактирования генов.

Направляющие РНК, полинуклеотиды, например полинуклеотиды, которые кодируют толерогенный фактор, или полинуклеотиды, которые кодируют эндонуклеазу, и эндонуклеазы,

описываемые в данном изобретении, могут быть составлены и доставлены в клетки любым известным в данной области техники способом.

Направляющие РНК и/или полинуклеотиды могут быть составлены с фармацевтически приемлемыми вспомогательными веществами, такими как носители, растворители, стабилизаторы, адьюванты, разбавители и т.д., в зависимости от конкретного способа введения и лекарственной формы. Композиции на основе направляющих РНК и/или полинуклеотидов могут быть составлены так, чтобы в них достигалось физиологически совместимое значение pH, которое варьируется в диапазоне от pH приблизительно 3 до pH приблизительно 11, от pH приблизительно 3 до pH приблизительно 7, что зависит от состава и пути введения. В некоторых случаях pH можно доводить до диапазона значений от приблизительно pH 5,0 до приблизительно pH 8. В некоторых случаях композиции могут содержать терапевтически эффективное количество по меньшей мере одного соединения, описанного в данном изобретении, вместе с одним или несколькими фармацевтически приемлемыми вспомогательными веществами. Композиции необязательно могут содержать комбинацию соединений, описанных в данном изобретении, или могут содержать второй активный ингредиент, применимые в лечении или предупреждении роста бактерий (например, без ограничения антибактериальные или антимикробные средства), или могут содержать комбинации реагентов по настоящему изобретению.

Подходящие вспомогательные вещества включают, например, молекулы-носители, которые включают крупные медленно метаболизируемые макромолекулы, такие как белки, полисахариды, полимолочные кислоты, полигликолевые кислоты, полимеры из аминокислот, сополимеры аминокислот и неактивные вирусные частицы. Другие типичные вспомогательные вещества могут включать антиоксиданты (например, без ограничения аскорбиновую кислоту), хелатообразующие средства (например, без ограничения EDTA), углеводы (например, без ограничения декстрина, гидроксипропилцеллюлозу и гидроксипропилметилцеллюлозу), стеариновую кислоту, жидкости (например, без ограничения масла, воду, солевой раствор, глицерин и этанол), смачивающие или эмульгирующие средства, pH-буферные вещества и т.п.

Полинуклеотиды направляющей РНК (РНК или ДНК) и/или полинуклеотид(полинуклеотиды) последовательности, кодирующей эндонуклеазу (РНК или ДНК), могут быть доставлены с помощью вирусных или невирусных средств для доставки, известных в данной области техники. Альтернативно полипептид(полипептиды), представляющий(представляющие) собой эндонуклеазу, может(могут) быть доставлен(доставлены) с использованием вирусных или невирусных средств для доставки, известных в данной области техники, таких как электропорация или липидные наночастицы. В дополнительных альтернативных аспектах эндонуклеаза ДНК может быть доставлена в виде одного или нескольких полипептидов по отдельности либо в виде предварительно образованного комплекса с одной или несколькими направляющими РНК или одной или несколькими crRNA вместе с tracrRNA.

Полинуклеотиды могут быть доставлены с помощью невирусных средств для доставки, в том числе без ограничения наночастиц, липосом, рибонуклеопротеинов, положительно заряженных пептидов, конъюгатов малая молекула-РНК, химерных соединений аптамер-РНК и комплексов РНК-слитый белок. Некоторые типичные невирусные средства для доставки описаны в Peer and Lieberman, *Gene Therapy*, 2011, 18:1127-1133 (в котором внимание сосредоточено на невирусных средствах для доставки siRNA, которые также применимы для доставки других полинуклеотидов).

Для полинуклеотидов по настоящему изобретению состав может быть выбран из любого из указанных, например, в международной заявке PCT/US2012/069610.

Полинуклеотиды, такие как направляющая РНК, sgRNA и mРНК, кодирующая эндонуклеазу, могут быть доставлены в клетку или субъекту посредством липидных наночастиц (LNP).

LNP означает любую частицу, имеющую диаметр менее 1000, 500, 250, 200, 150, 100, 75, 50 или 25 нм. Альтернативно размер наночастицы может находиться в диапазоне 1-1000, 1-500, 1-250, 25-200, 25-100, 35-75 или 25-60 нм.

LNP могут быть получены из катионных, анионных или нейтральных липидов. Нейтральные липиды, такие как фузогенный фосфолипид DOPE или компонент мембран холестерина, могут быть включены в LNP в качестве "липидов-помощников" для повышения трансфекционной активности и стабильности наночастиц. Ограничения катионных липидов включают низкую эффективность по причине недостаточной стабильности и быстрого выведения, а также формирования воспалительных или противовоспалительных ответов.

LNP также могут состоять из гидрофобных липидов, гидрофильных липидов или как гидрофобных, так и гидрофильных липидов.

Любой липид или комбинацию липидов, которые известны в данной области техники, можно использовать для получения LNP. Примерами липидов, используемых для получения LNP, являются: DOTMA, DOSPA, DOTAP, DMRIE, DC-холестерин, DOTAP-холестерин, GAP-DMORIE-DPyPE и GL67A-DOPE-DMPE-полиэтиленгликоль (PEG). Примерами катионных липидов являются: 98N12-5, C12-200, DLin-KC2-DMA (KC2), DLin-MC3-DMA (MC3), ХТС, MD1 и 7C1. Примерами нейтральных липидов являются: DPSC, DPPC, POPC, DOPE и SM. Примерами PEG-модифицированных липидов являются: PEG-DMG, PEG-CerC14 и PEG-CerC20.

Липиды можно объединять в любом количестве молярных соотношений для получения LNP. Кроме того, полинуклеотид(полинуклеотиды) можно объединять с липидом(липидами) в широком диапазоне молярных соотношений для получения LNP.

Для доставки можно применять рекомбинантный вектор на основе аденоассоциированного вируса (AAV). Методики получения частиц гAAV, в рамках которых клетке предоставляются геном AAV, подлежащий упаковке, содержащий полинуклеотид, подлежащий доставке, гены гер и сар, а также функциональные элементы вируса-помощника, являются стандартными в данной области техники. Для получения гAAV, как правило, необходимо, чтобы в одной клетке (обозначенной в данном изобретении как упаковывающая клетка) присутствовали следующие компоненты: геном гAAV, гены гер и сар AAV отдельно от генома гAAV (т.е. не в его составе) и функциональные элементы вируса-помощника. Гены гер и сар AAV могут быть получены из любого серотипа AAV, из которого может быть получен рекомбинантный вирус, и могут быть получены из серотипа AAV, отличного от серотипа, из которого получены ITR генома гAAV, в том числе без ограничения серотипов AAV, описываемых в данном изобретении. Получение псевдотипированного гAAV описано, например, в публикации международной патентной заявки № WO 01/83692.

Составление и введение клеток, например универсальных донорских клеток.

Генетически модифицированные клетки, например универсальные донорские клетки, описываемые в данном изобретении, могут быть составлены и введены субъекту любым способом, известным в данной области техники.

Термины "введение", "внедрение", "имплантация", "приживление трансплантата" и "трансплантация" используются взаимозаменяемо применительно к размещению клеток, например, клеток-предшественников в организме субъекта посредством способа или пути, который приводит к по меньшей мере частичной локализации введенных клеток в необходимом участке. Клетки, например, клетки-предшественники или их дифференцированное потомство можно вводить любым подходящим путем, который приводит к доставке в необходимое местоположение в организме субъекта, где по меньшей мере часть имплантированных клеток или компонентов клеток остаются жизнеспособными. Период жизнеспособности клеток после введения субъекту может составлять от такого короткого, как от нескольких часов, например двадцати четырех часов, до нескольких дней, до такого длинного, как несколько лет или даже вся продолжительность жизни субъекта, т.е. при долговременном приживлении трансплантата.

Генетически модифицированная клетка, например универсальная донорская клетка, описываемая в данном изобретении, может быть жизнеспособной после введения субъекту в течение более длительного периода, чем немодифицированная клетка.

В некоторых вариантах осуществления композиция, содержащая клетки, описанные в данном изобретении, может быть введена подходящим путем, который может включать внутривенное введение, например, в виде болюса или путем непрерывной инфузии в течение определенного периода времени. В некоторых вариантах осуществления внутривенное введение может быть выполнено внутримышечным, внутрибрюшинным, интрацеребральным, подкожным, внутрисуставным, интрасиновиальным или интракостальным путями. В некоторых вариантах осуществления композиция может быть в твердой, водной форме или жидкой форме. В некоторых вариантах осуществления водная или жидкая форма может быть распылена или лиофилизована. В некоторых вариантах осуществления распыленная или лиофилизованная форма может быть восстановлена водным или жидким раствором.

Клеточная композиция также может быть эмульгирована или представлена в виде липосомной композиции при условии, что процедура эмульгирования не оказывает неблагоприятного влияния на жизнеспособность клеток. Клетки и любой другой активный ингредиент могут быть смешаны со вспомогательными веществами, которые являются фармацевтически приемлемыми и совместимыми с активным ингредиентом, в количествах, подходящих для применения в терапевтических способах, описанных в данном изобретении.

Дополнительные средства, включенные в клеточную композицию, могут включать фармацевтически приемлемые соли ее компонентов. Фармацевтически приемлемые соли включают соли присоединения кислоты (образуемые при участии свободных аминогрупп полипептида), которые образуются с неорганическими кислотами, такими как, например, хлористоводородная или фосфорная кислоты, или с такими органическими кислотами, как уксусная, винная, миндальная и т.п. Соли, образуемые при участии свободных карбоксильных групп, также можно получать из неорганических оснований, таких как, например, гидроксиды натрия, калия, аммония, кальция или трехвалентного железа, и таких органических оснований, как изопропиламин, триметиламин, 2-этиламиноэтанол, гистидин, прокаиин и т.п.

Физиологически переносимые носители хорошо известны в данной области техники. Типичными жидкими носителями являются стерильные водные растворы, которые не содержат материалов в дополнение к активным ингредиентам и воде или содержат буфер, такой как фосфат натрия с физиологическим значением pH, физиологический раствор или и то и другое, как, например, фосфатно-буферный солевой раствор. Кроме того, водные носители могут содержать более одной буферной соли, а

также соли, такие как хлориды натрия и калия, декстрозу, полиэтиленгликоль и другие растворенные вещества. Жидкие композиции могут также содержать жидкие фазы в дополнение к воде и вместо воды. Типичными такими дополнительными жидкими фазами являются глицерин, растительные масла, такие как хлопковое масло, и эмульсия типа "масло в воде". Количество активного соединения, используемого в клеточных композициях, которое является эффективным в лечении конкретного нарушения или состояния, может зависеть от природы нарушения или состояния и может быть определено с помощью стандартных клинических методик.

В некоторых вариантах осуществления композиция, содержащая клетки, может быть введена субъекту, например субъекту-человеку, у которого имеется заболевание, есть подозрение на его наличие или риск его возникновения. В некоторых вариантах осуществления композиция может быть введена субъекту, у которого отсутствует заболевание, отсутствует подозрение на его наличие или у которого отсутствует риск возникновения заболевания или нарушения. В некоторых вариантах осуществления субъектом является здоровый человек. В некоторых вариантах осуществления субъект представляет собой, например, субъекта-человека, у которого имеется генетически наследуемое заболевание, есть подозрение на его наличие или риск его возникновения. В некоторых вариантах осуществления у субъекта имеются симптомы или имеется риск развития симптомов, свойственных заболеванию. В некоторых вариантах осуществления заболевание представляет собой диабет, например диабет типа I или диабет типа II.

VI. Конкретные композиции и способы по настоящему изобретению.

Соответственно настоящее изобретение, в частности, относится к следующим неограничивающим композициям и способам.

В первой композиции, композиции 1, в настоящем изобретении предусмотрена композиция, содержащая универсальную донорскую клетку, которая содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую первый толерогенный фактор, вставленную в пределах гена, кодирующего фактор выживания, или рядом с ним, где универсальная донорская клетка экспрессирует толерогенный фактор и характеризуется нарушенной экспрессией фактора выживания, и универсальная донорская клетка характеризуется повышенной способностью к ускользанию от иммунного ответа и/или выживаемостью клеток по сравнению с контрольной клеткой.

В другой композиции, композиции 2, в настоящем изобретении предусмотрена композиция в соответствии с композицией 1, где контрольная клетка представляет собой клетку дикого типа или клетку, которая не содержит вставленную нуклеотидную последовательность.

В другой композиции, композиции 3, в настоящем изобретении предусмотрена композиция в соответствии с композициями 1 или 2, где нарушенная экспрессия фактора выживания предусматривает сниженную или устраненную экспрессию.

В другой композиции, композиции 4, в настоящем изобретении предусмотрена композиция в соответствии с любой из композиций 1-3, где первый толерогенный фактор представляет собой PD-L1, HLA-E, HLA-G, CTLA-4 или CD47.

В другой композиции, композиции 5, в настоящем изобретении предусмотрена композиция в соответствии с любой из композиций 1-4, где фактор выживания представляет собой TXNIP, ZNF143, FOXO1, JNK или MANF.

В другой композиции, композиции 6, в настоящем изобретении предусмотрена композиция в соответствии с любой из композиций 1-5, где первый толерогенный фактор представляет собой HLA-E, и фактор выживания представляет собой TXNIP.

В другой композиции, композиции 7, в настоящем изобретении предусмотрена композиция в соответствии с композициями 5 или 6, где нуклеотидная последовательность, кодирующая HLA-E, содержит последовательность, кодирующую тример HLA-E, содержащий сигнальный пептид B2M, слитый с пептидом презентации HLA-G, слитым с мембранным белком B2M, слитым с HLA-E без его сигнального пептида.

В другой композиции, композиции 8, в настоящем изобретении предусмотрена композиция в соответствии с композицией 7, где последовательность, кодирующая тример HLA-E, состоит по сути из SEQ ID NO: 55.

В другой композиции, композиции 9, в настоящем изобретении предусмотрена композиция в соответствии с любой из композиций 1-8, где нуклеотидная последовательность, кодирующая первый толерогенный фактор, функционально связана с экзогенным промотором.

В другой композиции, композиции 10, в настоящем изобретении предусмотрена композиция в соответствии с композицией 9, где экзогенный промотор представляет собой промотор CMV, EF1 $\alpha$ , PGK, CAG или UBC.

В другой композиции, композиции 11, в настоящем изобретении предусмотрена композиция в соответствии с любой из композиций 1-10, дополнительно содержащая нуклеотидную последовательность, кодирующую второй толерогенный фактор, вставленный в пределах гена, кодирующего человеческий лейкоцитарный антиген MHC-I или MHC-II, или компонент, или регулятор транскрипции комплекса MHC-I или MHC-II, или рядом с ним, где универсальная донорская клетка

экспрессирует толерогенный фактор и характеризуется нарушенной экспрессией человеческого лейкоцитарного антигена МНС-I или МНС-II или компонента или регулятора транскрипции комплекса МНС-I или МНС-II.

В другой композиции, композиции 12, в настоящем изобретении предусмотрена композиция в соответствии с композицией 11, где нарушенная экспрессия человеческого лейкоцитарного антигена МНС-I или МНС-II или компонента или регулятора транскрипции комплекса МНС-I или МНС-II предусматривает сниженную или устраненную экспрессию.

В другой композиции, композиции 13, в настоящем изобретении предусмотрена композиция в соответствии с композициями 11 или 12, где второй толерогенный фактор представляет собой PD-L1, HLA-E, HLA-G, CTLA-4 или CD47.

В другой композиции, композиции 14, в настоящем изобретении предусмотрена композиция в соответствии с любой из композиций 11-13, где человеческий лейкоцитарный антиген МНС-I или МНС-II, или компонент, или регулятор транскрипции комплекса МНС-I или МНС-II представляет собой HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DP, HLA-DM, HLA-DOA, HLA-DOB, HLA-DQ, HLA-DR, B2M, NLRC5, СИТА, RFX5, RFXAP или RFXANK.

В другой композиции, композиции 15, в настоящем изобретении предусмотрена композиция в соответствии с любой из композиций 11-14, где второй толерогенный фактор представляет собой PD-L1, и человеческий лейкоцитарный антиген МНС-I или МНС-II, или компонент, или регулятор транскрипции комплекса МНС-I или МНС-II представляет собой B2M.

В другой композиции, композиции 16, в настоящем изобретении предусмотрена композиция в соответствии с композицией 15, где нуклеотидная последовательность, кодирующая PD-L1, состоит по сути из SEQ ID NO: 11.

В другой композиции, композиции 17, в настоящем изобретении предусмотрена композиция в соответствии с любой из композиций 11-16, где нуклеотидная последовательность, кодирующая второй толерогенный фактор, функционально связана с экзогенным промотором.

В другой композиции, композиции 18, в настоящем изобретении предусмотрена композиция в соответствии с композицией 17, где экзогенный промотор представляет собой промотор CMV, EF1 $\alpha$ , PGK, CAG или UBC.

В другой композиции, композиции 19, в настоящем изобретении предусмотрена композиция в соответствии с любой из композиций 11-18, где первый толерогенный фактор представляет собой HLA-E, фактор выживания представляет собой TXNIP, второй толерогенный фактор представляет собой PD-L1 и человеческий лейкоцитарный антиген МНС-I или МНС-II, или компонент, или регулятор транскрипции комплекса МНС-I или МНС-II представляет собой B2M.

В другой композиции, композиции 20, в настоящем изобретении предусмотрена композиция в соответствии с любой из композиций 1-19, где клетка представляет собой стволовую клетку.

В другой композиции, композиции 21, в настоящем изобретении предусмотрена композиция в соответствии с композицией 20, где стволовая клетка представляет собой эмбриональную стволовую клетку, стволовую клетку взрослого организма, индуцированную плюрипотентную стволовую клетку или гемопоэтическую стволовую клетку.

В другой композиции, композиции 22, в настоящем изобретении предусмотрена композиция в соответствии с любой из композиций 1-19, где клетка представляет собой дифференцированную клетку или соматическую клетку.

В другой композиции, композиции 23, в настоящем изобретении предусмотрена композиция в соответствии с любой из композиций 1-19, где клетка способна дифференцироваться в линиеспецифические клетки-предшественники или полностью дифференцированные соматические клетки.

В другой композиции, композиции 24, в настоящем изобретении предусмотрена композиция в соответствии с композицией 23, где линиеспецифические клетки-предшественники представляют собой предшественники энтодермальной части поджелудочной железы, предшественники эндокринной части поджелудочной железы, мезенхимальные клетки-предшественники, мышечные клетки-предшественники, бластные клетки, гемопоэтические клетки-предшественники или нервные клетки-предшественники.

В другой композиции, композиции 25, в настоящем изобретении предусмотрена композиция в соответствии с композицией 23, где полностью дифференцированные соматические клетки представляют собой бета-клетки поджелудочной железы, эпителиальные клетки, энтодермальные клетки, макрофаги, гепатоциты, адипоциты, клетки почки, клетки крови, кардиомиоциты или клетки иммунной системы.

В другой композиции, композиции 26, в настоящем изобретении предусмотрена композиция в соответствии с любой из композиций 1-25, где композиция содержит совокупность универсальных донорских клеток.

В другой композиции, композиции 27, в настоящем изобретении предусмотрена композиция в соответствии с композицией 26, где композиция содержит популяцию линиеспецифических клеток-предшественников или полностью дифференцированных соматических клеток, полученных из совокупности универсальных донорских клеток.

В другой композиции, композиции 28, в настоящем изобретении предусмотрена композиция в

соответствии с композицией 27, где линиеспецифические клетки-предшественники представляют собой предшественники энтодермальной части поджелудочной железы, предшественники эндокринной части поджелудочной железы, мезенхимальные клетки-предшественники, мышечные клетки-предшественники, бластные клетки, гемопоэтические клетки-предшественники или нервные клетки-предшественники, и полностью дифференцированные соматические клетки представляют собой бета-клетки поджелудочной железы, эпителиальные клетки, энтодермальные клетки, макрофаги, гепатоциты, адипоциты, клетки почки, клетки крови, кардиомиоциты или клетки иммунной системы.

В другой композиции, композиции 29, в настоящем изобретении предусмотрена композиция в соответствии с композициями 6 или 19, где композиция содержит совокупность универсальных донорских клеток.

В другой композиции, композиции 30, в настоящем изобретении предусмотрена композиция в соответствии с композицией 29, где композиция содержит популяцию линиеспецифических клеток-предшественников или полностью дифференцированных соматических клеток, полученных из совокупности универсальных донорских клеток.

В другой композиции, композиции 31, в настоящем изобретении предусмотрена композиция в соответствии с композицией 30, где линиеспецифические клетки-предшественники представляют собой клетки дефинитивной энтодермы, клетки первичной кишечной трубки, клетки задней части передней кишки, предшественники энтодермальной части поджелудочной железы, предшественники эндокринной части поджелудочной железы, незрелые бета-клетки или созревающие бета-клетки, и полностью дифференцированные соматические клетки представляют собой бета-клетки поджелудочной железы.

В другой композиции, композиции 32, в настоящем изобретении предусмотрена композиция в соответствии с композицией 26 или 29, где по меньшей мере приблизительно 50%, по меньшей мере приблизительно 70% или по меньшей мере приблизительно 90% клеток экспрессируют первый толерогенный фактор, второй толерогенный фактор или первый и второй толерогенные факторы.

В другой композиции, композиции 33, в настоящем изобретении предусмотрена композиция в соответствии с любой из композиций 27, 28, 30 или 31, где по меньшей мере приблизительно 50%, по меньшей мере приблизительно 70% или по меньшей мере приблизительно 90% клеток экспрессируют первый толерогенный фактор, второй толерогенный фактор или первый и второй толерогенные факторы.

В другой композиции, композиции 34, в настоящем изобретении предусмотрена композиция, содержащая совокупность клеток в соответствии с композицией 26 или популяцию клеток в соответствии с композициями 27 или 28.

В другой композиции, композиции 35, в настоящем изобретении предусмотрена композиция в соответствии с композицией 34 для применения при лечении субъекта, нуждающегося в этом.

В другой композиции, композиции 36, в настоящем изобретении предусмотрена композиция в соответствии с композицией 35, где у субъекта имеется заболевание, есть подозрение на его наличие или риск его возникновения.

В другой композиции, композиции 37, в настоящем изобретении предусмотрена композиция в соответствии с композицией 36, где заболевание представляет собой генетически наследуемое заболевание.

В другой композиции, композиции 38, в настоящем изобретении предусмотрена композиция, содержащая совокупность клеток в соответствии с композицией 29 или популяцию клеток в соответствии с композициями 30 или 31.

В другой композиции, композиции 39, в настоящем изобретении предусмотрена композиция в соответствии с композицией 38 для лечения диабета у субъекта, нуждающегося в этом.

В другой композиции, композиции 40, в настоящем изобретении предусмотрена композиция в соответствии с композицией 39, где у субъекта имеется диабет типа I или диабет типа II.

В другой композиции, композиции 41, в настоящем изобретении предусмотрена композиция в соответствии с любой из композиций 35-40, где субъект представляет собой человека.

В первом способе, способе 1, в настоящем изобретении предусмотрен способ получения клеток для введения субъекту, нуждающемуся в этом, при этом способ включает (а) получение или обеспечение получения совокупности универсальных донорских клеток в соответствии с любой из композиций 26, 29 или 32 и (б) поддержание совокупности универсальных донорских клеток в течение времени и в условиях, достаточных для того, чтобы клетки дифференцировались в линиеспецифические клетки-предшественники или полностью дифференцированные соматические клетки.

В другом способе, способе 2, в настоящем изобретении предусмотрен способ лечения субъекта, нуждающегося в этом, при этом способ включает (а) получение или обеспечение получения совокупности универсальных донорских клеток в соответствии с любой из композиций 26, 29 или 32 после дифференцировки в линиеспецифические клетки-предшественники или полностью дифференцированные соматические клетки и (б) введение линиеспецифических клеток-предшественников или полностью дифференцированных соматических клеток субъекту.

В другом способе, способе 3, в настоящем изобретении предусмотрен способ в соответствии со способом 2, где введение предусматривает имплантацию субъекту устройства, содержащего

линии специфические клетки-предшественники или полностью дифференцированные соматические клетки.

В другом способе, способе 4, в настоящем изобретении предусмотрен способ в соответствии с любым из способов 1-3, где линии специфические клетки-предшественники представляют собой предшественники энтодермальной части поджелудочной железы, предшественники эндокринной части поджелудочной железы, мезенхимальные клетки-предшественники, мышечные клетки-предшественники, бластные клетки, гемопоэтические клетки-предшественники или нервные клетки-предшественники, и полностью дифференцированные соматические клетки представляют собой бета-клетки поджелудочной железы, эпителиальные клетки, энтодермальные клетки, макрофаги, гепатоциты, адипоциты, клетки почки, клетки крови, кардиомиоциты или клетки иммунной системы.

В другом способе, способе 5, в настоящем изобретении предусмотрен способ в соответствии с любым из способов 1-4, где у субъекта имеется заболевание, есть подозрение на его наличие или риск его возникновения.

В другом способе, способе 6, в настоящем изобретении предусмотрен способ в соответствии со способом 5, где заболевание представляет собой генетически наследуемое заболевание.

В другом способе, способе 7, в настоящем изобретении предусмотрен способ в соответствии с любым из способов 1-6, где субъект представляет собой человека.

В другом способе, способе 8, в настоящем изобретении предусмотрен способ лечения диабета у субъекта, нуждающегося в этом, при этом способ включает (а) получение или обеспечение получения совокупности универсальных донорских клеток в соответствии с композицией 29 или 32 после дифференцировки в энтодермальные клетки поджелудочной железы, эндокринные клетки поджелудочной железы, незрелые бета-клетки, созревающие бета-клетки или бета-клетки поджелудочной железы и (б) введение субъекту энтодермальных клеток поджелудочной железы, эндокринных клеток поджелудочной железы, незрелых бета-клеток, созревающих бета-клеток или бета-клеток поджелудочной железы.

В другом способе, способе 9, в настоящем изобретении предусмотрен способ в соответствии со способом 8, где введение предусматривает имплантацию субъекту устройства, содержащего энтодермальные клетки поджелудочной железы, эндокринные клетки поджелудочной железы, незрелые бета-клетки, созревающие бета-клетки или бета-клетки поджелудочной железы.

В другом способе, способе 10, в настоящем изобретении предусмотрен способ в соответствии со способом 8 или 9, где у субъекта имеется диабет типа I или диабет типа II.

В другом способе, способе 11, в настоящем изобретении предусмотрен способ в соответствии с любым из способов 8-10, где субъект представляет собой человека.

В другой композиции, композиции 41, в настоящем изобретении предусмотрена композиция, содержащая универсальную донорскую клетку, которая содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую антиген гистосовместимости HLA класса I, альфа-цепь E (HLA-E), вставленную в пределах гена, кодирующего тиоредоксин-взаимодействующий белок (TXNIP), или рядом с ним, где универсальная донорская клетка экспрессирует HLA-E и характеризуется нарушенной экспрессией TXNIP, и универсальная донорская клетка характеризуется повышенной способностью к ускользанию от иммунного ответа и/или выживаемостью клеток по сравнению с контролем.

В другой композиции, композиции 42, в настоящем изобретении предусмотрена композиция в соответствии с композицией 41, где контрольная клетка представляет собой клетку дикого типа или клетку, которая не содержит вставленную нуклеотидную последовательность.

В другой композиции, композиции 43, в настоящем изобретении предусмотрена композиция в соответствии с композицией 41, где нарушенная экспрессия TXNIP предусматривает сниженную или устраненную экспрессию.

В другой композиции, композиции 44, в настоящем изобретении предусмотрена композиция в соответствии с композицией 41, где нуклеотидная последовательность, кодирующая HLA-E, содержит последовательность, кодирующую тример HLA-E, содержащий сигнальный пептид B2M, слитый с пептидом презентации HLA-G, слитым с мембранным белком B2M, слитым с HLA-E без его сигнального пептида.

В другой композиции, композиции 45, в настоящем изобретении предусмотрена композиция в соответствии с композицией 44, где последовательность, кодирующая тример HLA-E, состоит по сути из SEQ ID NO: 55.

В другой композиции, композиции 46, в настоящем изобретении предусмотрена композиция в соответствии с композицией 41, где нуклеотидная последовательность, кодирующая HLA-E, функционально связана с экзогенным промотором.

В другой композиции, композиции 47, в настоящем изобретении предусмотрена композиция в соответствии с композицией 41, где экзогенный промотор представляет собой промотор CAG.

В другой композиции, композиции 48, в настоящем изобретении предусмотрена композиция в соответствии с композицией 41, где клетка представляет собой стволовую клетку.

В другой композиции, композиции 49, в настоящем изобретении предусмотрена композиция в

соответствии с композицией 48, где стволовая клетка представляет собой эмбриональную стволовую клетку, стволовую клетку взрослого организма, индуцированную плюрипотентную стволовую клетку или гемопоэтическую стволовую клетку.

В другой композиции, композиции 50, в настоящем изобретении предусмотрена композиция в соответствии с композицией 41, где клетка представляет собой дифференцированную клетку или соматическую клетку.

В другой композиции, композиции 51, в настоящем изобретении предусмотрена композиция в соответствии с композицией 41, где клетка способна дифференцироваться в линиеспецифические клетки-предшественники или полностью дифференцированные соматические клетки.

В другой композиции, композиции 52, в настоящем изобретении предусмотрена композиция в соответствии с композицией 51, где линиеспецифические клетки-предшественники представляют собой клетки дефинитивной энтодермы, клетки первичной кишечной трубки, клетки задней части передней кишки, предшественники энтодермальной части поджелудочной железы, предшественники эндокринной части поджелудочной железы, незрелые бета-клетки или созревающие бета-клетки, и полностью дифференцированные соматические клетки представляют собой бета-клетки поджелудочной железы.

В другой композиции, композиции 53, в настоящем изобретении предусмотрена композиция, содержащая совокупность универсальных донорских клеток в соответствии с композицией 41.

В другой композиции, композиции 54, в настоящем изобретении предусмотрена композиция в соответствии с композицией 53, где по меньшей мере приблизительно 50% клеток экспрессируют HLA-E.

В другой композиции, композиции 55, в настоящем изобретении предусмотрена композиция в соответствии с композицией 53, где по меньшей мере приблизительно 70% клеток экспрессируют HLA-E.

В другой композиции, композиции 56, в настоящем изобретении предусмотрена композиция в соответствии с композицией 53, где по меньшей мере приблизительно 90% клеток экспрессируют HLA-E.

В другой композиции, композиции 57, в настоящем изобретении предусмотрена композиция, содержащая популяцию линиеспецифических клеток-предшественников или полностью дифференцированных соматических клеток, полученных из совокупности универсальных донорских клеток в соответствии с композицией 53.

В другой композиции, композиции 58, в настоящем изобретении предусмотрена композиция в соответствии с композицией 57, где линиеспецифические клетки-предшественники представляют собой клетки дефинитивной энтодермы, клетки первичной кишечной трубки, клетки задней части передней кишки, предшественники энтодермальной части поджелудочной железы, предшественники эндокринной части поджелудочной железы, незрелые бета-клетки или созревающие бета-клетки, и полностью дифференцированные соматические клетки представляют собой бета-клетки поджелудочной железы.

В другой композиции, композиции 59, в настоящем изобретении предусмотрена композиция в соответствии с композицией 58, где по меньшей мере приблизительно 50% клеток экспрессируют HLA-E.

В другой композиции, композиции 60, в настоящем изобретении предусмотрена композиция в соответствии с композицией 59, где по меньшей мере приблизительно 70% клеток экспрессируют HLA-E.

В другой композиции, композиции 61, в настоящем изобретении предусмотрена композиция в соответствии с композицией 59, где по меньшей мере приблизительно 90% клеток экспрессируют HLA-E.

В другой композиции, композиции 62, в настоящем изобретении предусмотрена композиция, содержащая генетически модифицированную клетку с введенной или повышенной экспрессией антигена гистосовместимости HLA класса I, альфа-цепи E (HLA-E), и нарушенной экспрессией тиоредоксин-взаимодействующего белка (TXNIP), где генетически модифицированная клетка характеризуется повышенной способностью к ускользанию от иммунного ответа и/или клеточной выживаемостью по сравнению с немодифицированной клеткой.

В другой композиции, композиции 63, в настоящем изобретении предусмотрена композиция в соответствии с композицией 62, которая содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую HLA-E, вставленную в пределах гена, кодирующего TXNIP, или рядом с ним, с обеспечением таким образом нарушения гена TXNIP.

В другой композиции, композиции 64, в настоящем изобретении предусмотрена композиция в соответствии с композицией 62, где нарушенная экспрессия TXNIP предусматривает сниженную или устраненную экспрессию.

В другом способе, способе 12, в настоящем изобретении предусмотрен способ лечения диабета у субъекта, нуждающегося в этом, при этом способ включает получение или обеспечение получения совокупности универсальных донорских клеток в соответствии с композицией 53 после дифференцировки в энтодермальные клетки поджелудочной железы, эндокринные клетки поджелудочной железы, незрелые бета-клетки, созревающие бета-клетки или бета-клетки поджелудочной железы и (b) введение субъекту энтодермальных клеток поджелудочной железы, эндокринных клеток поджелудочной железы, незрелых бета-клеток, созревающих бета-клеток или бета-клеток поджелудочной железы.

В другом способе, способе 13, в настоящем изобретении предусмотрен способ в соответствии со способом 12, где введение предусматривает имплантацию субъекту устройства, содержащего

энтодермальные клетки поджелудочной железы, эндокринные клетки поджелудочной железы, незрелые бета-клетки, созревающие бета-клетки или бета-клетки поджелудочной железы.

В другом способе, способе 14, в настоящем изобретении предусмотрен способ в соответствии со способом 12, где у субъекта имеется диабет типа I или диабет типа II.

В другом способе, способе 15, в настоящем изобретении предусмотрен способ в соответствии со способом 12, где субъект представляет собой человека.

В другой композиции, композиции 65, в настоящем изобретении предусмотрена композиция, содержащая универсальную донорскую клетку, которая содержит (а) нуклеотидную последовательность, кодирующую лиганд запрограммированной гибели 1 (PD-L1), вставленную в пределах гена, кодирующего бета-2-микроглобулин (B2M), или рядом с ним, и (b) нуклеотидную последовательность, кодирующую антиген гистосовместимости HLA класса I, альфа-цепь E (HLA-E), вставленную в пределах гена, кодирующего тиоредоксин-взаимодействующий белок (TXNIP), или рядом с ним, где универсальная донорская клетка экспрессирует PD-L1 и HLA-E и характеризуется нарушенной экспрессией B2M и TXNIP, и универсальная донорская клетка характеризуется повышенной способностью к ускользанию от иммунного ответа и/или выживаемостью клеток по сравнению с контрольной клеткой.

В другой композиции, композиции 66, в настоящем изобретении предусмотрена композиция в соответствии с композицией 65, где контрольная клетка представляет собой клетку дикого типа или клетку, которая не содержит вставленную нуклеотидную последовательность.

В другой композиции, композиции 67, в настоящем изобретении предусмотрена композиция в соответствии с композицией 65, где нарушенная экспрессия B2M предусматривает сниженную или устраненную экспрессию B2M, и нарушенная экспрессия TXNIP предусматривает сниженную или устраненную экспрессию TXNIP.

В другой композиции, композиции 68, в настоящем изобретении предусмотрена композиция в соответствии с композицией 65, где нуклеотидная последовательность, кодирующая PD-L1, состоит по сути из SEQ ID NO: 11.

В другой композиции, композиции 69, в настоящем изобретении предусмотрена композиция в соответствии с композицией 65, где нуклеотидная последовательность, кодирующая HLA-E, содержит последовательность, кодирующую тример HLA-E, содержащий сигнальный пептид B2M, слитый с пептидом презентации HLA-G, слитым с мембранным белком B2M, слитым с HLA-E без его сигнального пептида.

В другой композиции, композиции 70, в настоящем изобретении предусмотрена композиция в соответствии с композицией 69, где последовательность, кодирующая тример HLA-E, состоит по сути из SEQ ID NO: 55.

В другой композиции, композиции 71, в настоящем изобретении предусмотрена композиция в соответствии с композицией 65, где нуклеотидная последовательность, кодирующая PD-L1, функционально связана с экзогенным промотором, и нуклеотидная последовательность, кодирующая HLA-E, функционально связана с экзогенным промотором.

В другой композиции, композиции 72, в настоящем изобретении предусмотрена композиция в соответствии с композицией 71, где экзогенный промотор представляет собой промотор CAG.

В другой композиции, композиции 73, в настоящем изобретении предусмотрена композиция в соответствии с композицией 65, где клетка представляет собой стволовую клетку.

В другой композиции, композиции 74, в настоящем изобретении предусмотрена композиция в соответствии с композицией 73, где стволовая клетка представляет собой эмбриональную стволовую клетку, стволовую клетку взрослого организма, индуцированную плюрипотентную стволовую клетку или гемопоэтическую стволовую клетку.

В другой композиции, композиции 75, в настоящем изобретении предусмотрена композиция в соответствии с композицией 65, где клетка представляет собой дифференцированную клетку или соматическую клетку.

В другой композиции, композиции 76, в настоящем изобретении предусмотрена композиция в соответствии с композицией 65, где клетка способна дифференцироваться в линиеспецифические клетки-предшественники или полностью дифференцированные соматические клетки.

В другой композиции, композиции 77, в настоящем изобретении предусмотрена композиция в соответствии с композицией 76, где линиеспецифические клетки-предшественники представляют собой клетки дефинитивной энтодермы, клетки первичной кишечной трубки, клетки задней части передней кишки, предшественники энтодермальной части поджелудочной железы, предшественники эндокринной части поджелудочной железы, незрелые бета-клетки или созревающие бета-клетки, а полностью дифференцированные соматические клетки представляют собой бета-клетки поджелудочной железы.

В другой композиции, композиции 78, в настоящем изобретении предусмотрена композиция, содержащая совокупность универсальных донорских клеток в соответствии с композицией 65.

В другой композиции, композиции 79, в настоящем изобретении предусмотрена композиция в соответствии с композицией 78, где по меньшей мере приблизительно 50% клеток экспрессируют PD-L1

и/или по меньшей мере приблизительно 50% клеток экспрессируют HLA-E.

В другой композиции, композиции 80, в настоящем изобретении предусмотрена композиция в соответствии с композицией 78, где по меньшей мере приблизительно 70% клеток экспрессируют PD-L1 и/или по меньшей мере приблизительно 70% клеток экспрессируют HLA-E.

В другой композиции, композиции 81, в настоящем изобретении предусмотрена композиция в соответствии с композицией 78, где по меньшей мере приблизительно 90% клеток экспрессируют PD-L1 и/или по меньшей мере приблизительно 90% клеток экспрессируют HLA-E.

В другой композиции, композиции 82, в настоящем изобретении предусмотрена композиция, содержащая популяцию линиеспецифических клеток-предшественников или полностью дифференцированных соматических клеток, полученных из совокупности универсальных донорских клеток в соответствии с композицией 78.

В другой композиции, композиции 83, в настоящем изобретении предусмотрена композиция в соответствии с композицией 82, где линиеспецифические клетки-предшественники представляют собой клетки дефинитивной энтодермы, клетки первичной кишечной трубки, клетки задней части передней кишки, предшественники энтодермальной части поджелудочной железы, предшественники эндокринной части поджелудочной железы, незрелые бета-клетки или созревающие бета-клетки, и полностью дифференцированные соматические клетки представляют собой бета-клетки поджелудочной железы.

В другой композиции, композиции 84, в настоящем изобретении предусмотрена композиция в соответствии с композицией 83, где по меньшей мере приблизительно 50% клеток экспрессируют PD-L1 и/или по меньшей мере приблизительно 50% клеток экспрессируют HLA-E.

В другой композиции, композиции 85, в настоящем изобретении предусмотрена композиция в соответствии с композицией 83, где по меньшей мере приблизительно 70% клеток экспрессируют PD-L1 и/или по меньшей мере приблизительно 70% клеток экспрессируют HLA-E.

В другой композиции, композиции 86, в настоящем изобретении предусмотрена композиция в соответствии с композицией 83, где по меньшей мере приблизительно 90% клеток экспрессируют PD-L1 и/или по меньшей мере приблизительно 90% клеток экспрессируют HLA-E.

В другой композиции, композиции 87, в настоящем изобретении предусмотрена композиция, содержащая генетически модифицированную клетку с введенной или повышенной экспрессией PD-L1 и HLA-E и нарушенной экспрессией B2M и TXNIP, где генетически модифицированная клетка характеризуется повышенной способностью к ускользанию от иммунного ответа и/или клеточной выживаемостью по сравнению с немодифицированной клеткой.

В другой композиции, композиции 88, в настоящем изобретении предусмотрена композиция в соответствии с композицией 87, которая содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую PD-L1, вставленную в пределах гена, кодирующего B2M, или рядом с ним, с обеспечением таким образом нарушения гена B2M, и нуклеотидную последовательность, кодирующую HLA-E, вставленную в пределах гена, кодирующего TXNIP, или рядом с ним, с обеспечением таким образом нарушения гена TXNIP.

В другой композиции, композиции 89, в настоящем изобретении предусмотрена композиция в соответствии с композицией 87, где нарушенная экспрессия B2M и TXNIP предусматривает сниженную или устраненную экспрессию B2M и TXNIP.

В другом способе, способе 16, в настоящем изобретении предусмотрен способ лечения диабета у субъекта, нуждающегося в этом, при этом способ включает (а) получение или обеспечение получения совокупности универсальных донорских клеток в соответствии с композицией 78 после дифференцировки в энтодермальные клетки поджелудочной железы, эндокринные клетки поджелудочной железы, незрелые бета-клетки, созревающие бета-клетки или бета-клетки поджелудочной железы и (б) введение субъекту энтодермальных клеток поджелудочной железы, эндокринных клеток поджелудочной железы, незрелых бета-клеток, созревающих бета-клеток или бета-клеток поджелудочной железы.

В другом способе, способе 17, в настоящем изобретении предусмотрен способ в соответствии со способом 16, где введение предусматривает имплантацию субъекту устройства, содержащего энтодермальные клетки поджелудочной железы, эндокринные клетки поджелудочной железы, незрелые бета-клетки, созревающие бета-клетки или бета-клетки поджелудочной железы.

В другом способе, способе 18, в настоящем изобретении предусмотрен способ в соответствии со способом 16, где у субъекта имеется диабет типа I или диабет типа II.

В другом способе, способе 19, в настоящем изобретении предусмотрен способ в соответствии со способом 16, где субъект представляет собой человека.

В другом способе, способе 20, в настоящем изобретении предусмотрен способ получения универсальной донорской клетки, при этом способ включает доставку в клетку (а) первой сайт-направленной нуклеазы, нацеленной на сайт в пределах гена, кодирующего фактор выживания, или рядом с ним, и (б) первой нуклеиновой кислоты, содержащей нуклеотидную последовательность, кодирующую первый толерогенный фактор, которая фланкирована (i) нуклеотидной последовательностью, гомологичной участку, расположенному слева от целевого сайта из (а), и (ii) нуклеотидной последовательностью, гомологичной участку, расположенному справа от целевого сайта из (а), где первая сайт-направленная

нуклеаза расщепляет целевой сайт из (a), и первая нуклеиновая кислота из (b) вставляется в сайт, который частично перекрывает сайт из (a), полностью перекрывает его или содержится в нем, с обеспечением таким образом получения универсальной донорской клетки, где универсальная донорская клетка характеризуется повышенной выживаемостью клеток по сравнению с клеткой, в которую не была вставлена данная нуклеиновая кислота из (b).

В другом способе, способе 21, в настоящем изобретении предусмотрен способ в соответствии со способом 20, где фактор выживания представляет собой TXNIP, ZNF143, FOXO1, JNK или MANF.

В другом способе, способе 22, в настоящем изобретении предусмотрен способ в соответствии со способами 20 или 21, где первый толерогенный фактор представляет собой PD-L1, HLA-E, HLA-G, CTLA-4 или CD47.

В другом способе, способе 23, в настоящем изобретении предусмотрен способ в соответствии с любым из способов 20-22, где фактор выживания представляет собой TXNIP.

В другом способе, способе 24, в настоящем изобретении предусмотрен способ в соответствии со способом 23, где первый толерогенный фактор представляет собой HLA-E.

В другом способе, способе 25, в настоящем изобретении предусмотрен способ в соответствии с любым из способов 20-24, где первая сайт-направленная нуклеаза представляет собой систему CRISPR, включающую CRISPR-нуклеазу и направляющую РНК (gRNA).

В другом способе, способе 26, в настоящем изобретении предусмотрен способ в соответствии с любым из способов 20-25, где CRISPR-нуклеаза представляет собой нуклеазу Cas9 типа II или нуклеазу Cfp1 типа V, и CRISPR-нуклеаза связана с по меньшей мере одним сигналом ядерной локализации.

В другом способе, способе 27, в настоящем изобретении предусмотрен способ в соответствии с любым из способов 20-26, где gRNA содержит спейсерную последовательность, соответствующую целевой последовательности, состоящей из SEQ ID NO: 15-24.

В другом способе, способе 28, в настоящем изобретении предусмотрен способ в соответствии с любым из способов 25-27, где нуклеотидная последовательность из (b) (i) состоит по сути из SEQ ID NO: 25, и нуклеотидная последовательность из (b) (ii) состоит по сути из SEQ ID NO: 32.

В другом способе, способе 29, в настоящем изобретении предусмотрен способ, в соответствии с любым из способов 20-28, где способ дополнительно предусматривает доставку в клетку (c) второй сайт-направленной нуклеазы, нацеленной на сайт в пределах гена, который кодирует один или несколько человеческих лейкоцитарных антигенов МНС-I или МНС-II, или компонент, или регулятор транскрипции комплекса МНС-I или МНС-II, или рядом с ним, и (d) второй нуклеиновой кислоты, содержащей нуклеотидную последовательность, кодирующую второй толерогенный фактор, которая фланкирована (iii) нуклеотидной последовательностью, гомологичной участку, расположенному слева от целевого сайта из (c), и (iv) нуклеотидной последовательностью, гомологичной участку, расположенному справа от целевого сайта из (c), где второй толерогенный фактор из (d) отличается от первого толерогенного фактора (b), где вторая сайт-направленная нуклеаза расщепляет целевой сайт из (c), и вторая нуклеиновая кислота из (d) вставляется в сайт, который частично перекрывает сайт из (c), полностью перекрывает его или содержится в нем, где универсальная донорская клетка характеризуется повышенной способностью к ускользанию от иммунного надзора и/или выживаемостью клеток по сравнению с клеткой, в которую не была вставлена вторая нуклеиновая кислота из (d).

В другом способе, способе 30, в настоящем изобретении предусмотрен способ в соответствии со способом 29, где человеческий лейкоцитарный антиген МНС-I или МНС-II, или компонент, или регулятор транскрипции комплекса МНС-I или МНС-II представляет собой HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DP, HLA-DM, HLA-DOA, HLA-DOB, HLA-DQ, HLA-DR, B2M, NLRC5, CIITA, RFX5, RFXAP или RFXANK.

В другом способе, способе 31, в настоящем изобретении предусмотрен способ в соответствии со способами 29 или 30, где второй толерогенный фактор представляет собой PD-L1, HLA-E, HLA-G, CTLA-4 или CD47.

В другом способе, способе 32, в настоящем изобретении предусмотрен способ в соответствии с любым из способов 29-31, где человеческий лейкоцитарный антиген МНС-I или МНС-II, или компонент, или регулятор транскрипции комплекса МНС-I или МНС-II представляет собой B2M.

В другом способе, способе 33, в настоящем изобретении предусмотрен способ в соответствии со способом 32, где второй толерогенный фактор представляет собой PD-L1.

В другом способе, способе 34, в настоящем изобретении предусмотрен способ в соответствии с любым из способов 29-33, где вторая сайт-направленная нуклеаза представляет собой систему CRISPR, включающую CRISPR-нуклеазу и gRNA.

В другом способе, способе 35, в настоящем изобретении предусмотрен способ в соответствии со способом 34, где CRISPR-нуклеаза представляет собой нуклеазу Cas9 типа II или нуклеазу Cfp1 типа V, и CRISPR-нуклеаза связана с по меньшей мере одним сигналом ядерной локализации.

В другом способе, способе 36, в настоящем изобретении предусмотрен способ в соответствии со способами 34 или 35, где gRNA содержит спейсерную последовательность, соответствующую целевой последовательности, состоящей из SEQ ID NO: 1-3 или 35-44.

В другом способе, способе 37, в настоящем изобретении предусмотрен способ в соответствии с

любым из способов 34-36, где нуклеотидная последовательность (d) (iii) состоит по сути из SEQ ID NO: 7, и нуклеотидная последовательность из (d) (iv) состоит по сути из SEQ ID NO: 13.

В другом способе, способе 38, в настоящем изобретении предусмотрен способ в соответствии с любым из способов 25-28 или 34-37, где CRISPR-нуклеаза и gRNA присутствуют при молярном соотношении 1:3.

В другом способе, способе 39, в настоящем изобретении предусмотрен способ в соответствии с любым из способов 20-38, где нуклеотидная последовательность, кодирующая первый толерогенный фактор, функционально связана с экзогенным промотором, и нуклеотидная последовательность, кодирующая второй толерогенный фактор, функционально связана с экзогенным промотором.

В другом способе, способе 40, в настоящем изобретении предусмотрен способ в соответствии со способом 39, где экзогенный промотор представляет собой конститутивный, индуцируемый, времяспецифический, тканеспецифический или клеточноспецифический промотор, где экзогенный промотор необязательно представляет собой промотор CMV, EF1 $\alpha$ , PGK, CAG или UBC.

В другом способе, способе 41, в настоящем изобретении предусмотрен способ А получения универсальной донорской клетки, при этом способ включает доставку в клетку (a) первой сайт-направленной нуклеазы, нацеленной на сайт в пределах гена, который кодирует фактор выживания, или рядом с ним; (b) первой нуклеиновой кислоты, содержащей нуклеотидную последовательность, кодирующую первый толерогенный фактор, которая фланкирована (i) нуклеотидной последовательностью, гомологичной участку, расположенному слева от целевого сайта из (a), и (ii) нуклеотидной последовательностью, гомологичной участку, расположенному справа от целевого сайта из (a), где первая сайт-направленная нуклеаза расщепляет целевой сайт из (a), и в процессе гомологичной рекомбинации первая нуклеиновая кислота из (b) используется в качестве матрицы для вставки нуклеотидной последовательности, кодирующей первый толерогенный фактор, в сайт, который частично перекрывает сайт из (a), полностью перекрывает его или содержится в нем, с обеспечением таким образом нарушения гена (a); (c) второй сайт-направленной нуклеазы, нацеленной на сайт в пределах гена, который кодирует один или несколько человеческих лейкоцитарных антигенов MHC-I или MHC-II, или компонент, или регулятор транскрипции комплекса MHC-I или MHC-II, или рядом с ним; и (d) второй нуклеиновой кислоты, содержащей нуклеотидную последовательность, кодирующую второй толерогенный фактор, которая фланкирована (iii) нуклеотидной последовательностью, гомологичной участку, расположенному слева от целевого сайта из (c), и (iv) нуклеотидной последовательностью, гомологичной участку, расположенному справа от целевого сайта из (c), где толерогенный фактор из (d) отличается от толерогенного фактора (b), где вторая сайт-направленная нуклеаза расщепляет целевой сайт из (c) и в процессе гомологичной рекомбинации вторая нуклеиновая кислота из (d) используется в качестве матрицы для вставки нуклеотидной последовательности, кодирующей второй толерогенный фактор, в сайт, который частично перекрывает сайт из (c), полностью перекрывает его или содержится в нем, с обеспечением таким образом нарушения гена из (c), за счет чего обеспечивается получение универсальной донорской клетки, где универсальная донорская клетка характеризуется повышенной выживаемостью клеток по сравнению с клеткой, в которую не были вставлены первая нуклеиновая кислота из (b) и вторая нуклеиновая кислота из (d).

В другом способе, способе 42, в настоящем изобретении предусмотрен способ в соответствии со способом 41, где фактор выживания представляет собой TXNIP, первый толерогенный фактор представляет собой HLA-E, человеческий лейкоцитарный антиген MHC-I или MHC-II, или компонент, или регулятор транскрипции комплекса MHC-I или MHC-II представляет собой B2M, и второй толерогенный фактор представляет собой PD-L1.

В другом способе, способе 43, в настоящем изобретении предусмотрен способ в соответствии с любым из способов 20-42, где клетка представляет собой клетку млекопитающего, при этом клетка необязательно представляет собой клетку человека.

В другом способе, способе 44, в настоящем изобретении предусмотрен способ в соответствии с любым из способов 20-43, где клетка представляет собой стволовую клетку.

В другом способе, способе 45, в настоящем изобретении предусмотрен способ в соответствии с любым из способов 20-43, где клетка представляет собой плюрипотентную стволовую клетку, эмбриональную стволовую клетку, стволовую клетку взрослого организма, индуцированную плюрипотентную стволовую клетку или гемопоэтическую стволовую клетку.

В другом способе, способе 46, в настоящем изобретении предусмотрен способ в соответствии с любым из способов 20-43, где клетка представляет собой дифференцированную клетку или соматическую клетку.

В другом способе, способе 47, в настоящем изобретении предусмотрен способ в соответствии с любым из способов 20-43, где универсальная донорская клетка способна дифференцироваться в линиеспецифические клетки-предшественники или полностью дифференцированные соматические клетки.

В другом способе, способе 48, в настоящем изобретении предусмотрен способ в соответствии со способом 47, где линиеспецифические клетки-предшественники представляют собой предшественники

энтодермальной части поджелудочной железы, предшественники эндокринной части поджелудочной железы, мезенхимальные клетки-предшественники, мышечные клетки-предшественники, бластные клетки, гемопоэтические клетки-предшественники или нервные клетки-предшественники.

В другом способе, способе 49, в настоящем изобретении предусмотрен способ в соответствии со способом 47, где полностью дифференцированные соматические клетки представляют собой эндокринные секреторные клетки, такие как бета-клетки поджелудочной железы, эпителиальные клетки, энтодермальные клетки, макрофаги, гепатоциты, адипоциты, клетки почки, клетки крови или клетки иммунной системы.

В другом способе, способе 49А, в настоящем изобретении предусмотрен способ в соответствии со способом 47, где полностью дифференцированные соматические клетки представляют собой кардиомиоциты или клетки иммунной системы.

В другой композиции, композиции 90, в настоящем изобретении предусмотрена композиция, содержащая совокупность универсальных донорских клеток, полученных в соответствии с любым из способов 20-49.

В другой композиции, композиции 91, в настоящем изобретении предусмотрена композиция в соответствии с композицией 90, поддерживаемая в течение времени и в условиях, достаточных для того, чтобы клетки подверглись дифференцировке.

В другой композиции, композиции 92, в настоящем изобретении предусмотрена композиция в соответствии с композицией 90 или 91 для применения при лечении субъекта, нуждающегося в этом.

В другой композиции, композиции 93, в настоящем изобретении предусмотрена композиция в соответствии с композицией 92, где у субъекта имеется заболевание, есть подозрение на его наличие или риск его возникновения.

В другом способе, способе 50, в настоящем изобретении предусмотрен способ, предусматривающий введение субъекту совокупности универсальных донорских клеток в соответствии с композициями 90 или 91.

В другом способе, способе 51, в настоящем изобретении предусмотрен способ лечения субъекта, нуждающегося в этом, при этом способ включает (а) получение или обеспечение получения совокупности универсальных донорских клеток в соответствии с композицией 90 после дифференцировки в линиеспецифические клетки-предшественники или полностью дифференцированные соматические клетки; и (б) введение линиеспецифических клеток-предшественников или полностью дифференцированных соматических клеток субъекту.

В другом способе, способе 52, в настоящем изобретении предусмотрен способ получения клеток для введения субъекту, нуждающемуся в этом, при этом способ включает (а) получение или обеспечение получения универсальных донорских клеток по пункту 31; и (б) поддержание универсальных донорских клеток в течение времени и в условиях, достаточных для того, чтобы клетки дифференцировались в линиеспецифические клетки-предшественники или полностью дифференцированные соматические клетки.

В другом способе, способе 53, в настоящем изобретении предусмотрен способ в соответствии со способами 51 или 52, где линиеспецифические клетки-предшественники представляют собой предшественники энтодермальной части поджелудочной железы, предшественники эндокринной части поджелудочной железы, мезенхимальные клетки-предшественники, мышечные клетки-предшественники, бластные клетки, гемопоэтические клетки-предшественники или нервные клетки-предшественники.

В другом способе, способе 54, в настоящем изобретении предусмотрен способ в соответствии со способами 51 или 52, где полностью дифференцированные соматические клетки представляют собой эндокринные секреторные клетки, такие как бета-клетки поджелудочной железы, эпителиальные клетки, энтодермальные клетки, макрофаги, гепатоциты, адипоциты, клетки почки, клетки крови или клетки иммунной системы.

В другом способе, способе 54А, в настоящем изобретении предусмотрен способ в соответствии со способом 51 или 52, где полностью дифференцированные соматические клетки представляют собой кардиомиоциты.

В другом способе, способе 55, в настоящем изобретении предусмотрен способ в соответствии со способами 50-54, где субъект представляет собой человека, у которого имеется заболевание, есть подозрение на его наличие или риск его возникновения.

В другом способе, способе 56, в настоящем изобретении предусмотрен способ в соответствии со способом 55, где заболевание представляет собой генетически наследуемое заболевание.

В другой композиции, композиции 93, в настоящем изобретении предусмотрена направляющая РНК, содержащая спейсерную последовательность, соответствующую целевой последовательности, состоящей из SEQ ID NO: 15-24.

В другом способе, способе 57, в настоящем изобретении предусмотрен способ *in vitro* получения универсальной донорской клетки, при этом способ включает доставку в стволовую клетку (а) РНК-направляемой нуклеазы; (б) направляющей РНК (gRNA), нацеленной на целевой сайт в локусе гена тиоредоксин-взаимодействующего белка (TXNIP); и (с) вектора, содержащего нуклеиновую

кислоту, где нуклеиновая кислота содержит (i) нуклеотидную последовательность, кодирующую толерогенный фактор; (ii) нуклеотидную последовательность, состоящую по сути из SEQ ID NO: 25 и характеризующуюся наличием гомологии последовательности с геномным участком, расположенным слева и в пределах 50 азотистых оснований от целевого сайта; и (iii) нуклеотидную последовательность, состоящую по сути из SEQ ID NO: 32 и характеризующуюся наличием гомологии последовательности с геномным участком, расположенным справа и в пределах 50 азотистых оснований от целевого сайта, где (i) фланкирована с помощью (ii) и (iii); при этом локус гена TXNIP расщепляется в целевом сайте, и нуклеиновая кислота вставляется в локус гена TXNIP, с обеспечением таким образом нарушения гена TXNIP и получение универсальной донорской клетки, где универсальная донорская клетка характеризуется повышенной способностью к ускользанию от иммунного ответа и/или выживаемостью клеток по сравнению с контрольной клеткой.

В другом способе, способе 57A, в настоящем изобретении предусмотрен способ в соответствии со способом 57, где нуклеиновая кислота вставляется в локус гена TXNIP в пределах 50 пар оснований от целевого сайта.

В другом способе, способе 58, в настоящем изобретении предусмотрен способ в соответствии со способом 57, где контрольная клетка представляет собой клетку дикого типа или клетку, которая не содержит вставленную нуклеиновую кислоту.

В другом способе, способе 59, в настоящем изобретении предусмотрен способ в соответствии со способом 57, где нарушенный ген TXNIP характеризуется сниженной или устраненной экспрессией TXNIP.

В другом способе, способе 60, в настоящем изобретении предусмотрен способ в соответствии со способом 57, где gRNA содержит спейсерную последовательность, соответствующую последовательности, состоящей из SEQ ID NO: 15-24.

В другом способе, способе 61, в настоящем изобретении предусмотрен способ в соответствии со способом 57, где gRNA содержит спейсерную последовательность, соответствующую последовательности, состоящей из SEQ ID NO: 20.

В другом способе, способе 62, в настоящем изобретении предусмотрен способ в соответствии со способом 57, где вектор представляет собой плазмидный вектор.

В другом способе, способе 63, в настоящем изобретении предусмотрен способ в соответствии со способом 57, где толерогенный фактор представляет собой антиген гистосовместимости HLA класса I, альфа-цепь E (HLA-E).

В другом способе, способе 64, в настоящем изобретении предусмотрен способ в соответствии со способом 63, где нуклеотидная последовательность, кодирующая HLA-E, содержит последовательность, кодирующую тример HLA-E, содержащий сигнальный пептид B2M, слитый с пептидом презентации HLA-G, слитым с мембранным белком B2M, слитым с HLA-E без его сигнального пептида.

В другом способе, способе 65, в настоящем изобретении предусмотрен способ в соответствии со способом 63, где последовательность, кодирующая тример HLA-E, состоит по сути из SEQ ID NO: 55.

В другом способе, способе 66, в настоящем изобретении предусмотрен способ в соответствии со способом 65, где последовательность, кодирующая тример HLA-E, функционально связана с экзогенным промотором.

В другом способе, способе 67, в настоящем изобретении предусмотрен способ в соответствии со способом 66, где экзогенный промотор представляет собой промотор CMV, EF1 $\alpha$ , PGK, CAG или UBC.

В другом способе, способе 68, в настоящем изобретении предусмотрен способ в соответствии со способом 57, где РНК-направляемая нуклеаза представляет собой нуклеазу Cas9.

В другом способе, способе 69, в настоящем изобретении предусмотрен способ в соответствии со способом 68, где нуклеаза Cas9 связана с по меньшей мере одним сигналом ядерной локализации.

В другом способе, способе 70, в настоящем изобретении предусмотрен способ в соответствии со способом 69, где нуклеаза Cas9 и gRNA присутствуют при молярном соотношении 1:3.

В другом способе, способе 71, в настоящем изобретении предусмотрен способ в соответствии со способом 57, где стволовая клетка представляет собой эмбриональную стволовую клетку, стволовую клетку взрослого организма, индуцированную плюрипотентную стволовую клетку или гемопоэтическую стволовую клетку.

В другом способе, способе 72, в настоящем изобретении предусмотрен способ в соответствии со способом 57, где стволовая клетка представляет собой стволовую клетку человека.

В другом способе, способе 73, в настоящем изобретении предусмотрен способ *in vitro* получения универсальной донорской клетки, при этом способ включает доставку в стволовую клетку (a) РНК-направляемой нуклеазы; (b) направляющей РНК (gRNA), нацеленной на целевой сайт в локусе гена тиоредоксин-взаимодействующего белка (TXNIP); и (c) вектора, содержащего нуклеиновую кислоту, где нуклеиновая кислота содержит (i) нуклеотидную последовательность, кодирующую толерогенный фактор; (ii) нуклеотидную последовательность, характеризующуюся наличием гомологии последовательности с геномным участком, расположенным слева и в пределах 50 азотистых оснований от целевого сайта; и (iii) нуклеотидную последовательность, характеризующуюся наличием гомологии последовательности с

геномным участком, расположенным справа и в пределах 50 азотистых оснований от целевого сайта, где (i) фланкирована с помощью (ii) и (iii), и вектор содержит нуклеотидную последовательность, состоящую из SEQ ID NO: 34 или 56; при этом локус гена TXNIP расщепляется в целевом сайте, и нуклеиновая кислота вставляется в локус гена TXNIP, с обеспечением таким образом нарушения гена TXNIP и получение универсальной донорской клетки, где универсальная донорская клетка характеризуется повышенной способностью к ускользанию от иммунного ответа и/или выживаемостью клеток по сравнению с контрольной клеткой.

В другом способе, способе 73A, в настоящем изобретении предусмотрен способ в соответствии со способом 73, где нуклеиновая кислота вставляется в локус гена TXNIP в пределах 50 пар оснований от целевого сайта.

В другом способе, способе 74, в настоящем изобретении предусмотрен способ в соответствии со способом 73, где контрольная клетка представляет собой клетку дикого типа или клетку, которая не содержит вставленную нуклеиновую кислоту.

В другом способе, способе 75, в настоящем изобретении предусмотрен способ в соответствии со способом 73, где нарушенный ген TXNIP характеризуется сниженной или устраненной экспрессией TXNIP.

В другом способе, способе 76, в настоящем изобретении предусмотрен способ в соответствии со способом 73, где gRNA содержит спейсерную последовательность, соответствующую последовательности, состоящей из SEQ ID NO: 15-24.

В другом способе, способе 77, в настоящем изобретении предусмотрен способ в соответствии со способом 73, где gRNA содержит спейсерную последовательность, соответствующую последовательности, состоящей из SEQ ID NO: 20.

В другом способе, способе 78, в настоящем изобретении предусмотрен способ в соответствии со способом 73, где вектор представляет собой плазмидный вектор.

В другом способе, способе 79, в настоящем изобретении предусмотрен способ в соответствии со способом 73, где толерогенный фактор представляет собой антиген гистосовместимости HLA класса I, альфа-цепь E (HLA-E).

В другом способе, способе 80, в настоящем изобретении предусмотрен способ в соответствии со способом 73, где РНК-направляемая нуклеаза представляет собой нуклеазу Cas9.

В другом способе, способе 81, в настоящем изобретении предусмотрен способ в соответствии со способом 80, где нуклеаза Cas9 связана с по меньшей мере одним сигналом ядерной локализации.

В другом способе, способе 82, в настоящем изобретении предусмотрен способ в соответствии со способом 80, где нуклеаза Cas9 и gRNA присутствуют при молярном соотношении 1:3.

В другом способе, способе 83, в настоящем изобретении предусмотрен способ в соответствии со способом 73, где стволовая клетка представляет собой эмбриональную стволовую клетку, стволовую клетку взрослого организма, индуцированную плюрипотентную стволовую клетку или гемопоэтическую стволовую клетку.

В другом способе, способе 84, в настоящем изобретении предусмотрен способ в соответствии со способом 73, где стволовая клетка представляет собой стволовую клетку человека.

В другом способе, способе 85, в настоящем изобретении предусмотрен способ *in vitro* получения универсальной донорской клетки, при этом способ включает доставку в стволовую клетку (a) первого рибонуклеопротеинового (RNP) комплекса, содержащего РНК-направляемую нуклеазу и направляющую РНК (gRNA), нацеленную на целевой сайт в локусе гена бета-2-микроглобулина (B2M); (b) первого вектора, содержащего нуклеиновую кислоту, где нуклеиновая кислота содержит (i) нуклеотидную последовательность, кодирующую первый толерогенный фактор; (ii) нуклеотидную последовательность, состоящую по сути из SEQ ID NO: 7 и характеризующуюся наличием гомологии последовательности с геномным участком, расположенным слева и в пределах 50 азотистых оснований от целевого сайта в локусе гена B2M; и (iii) нуклеотидную последовательность, состоящую по сути из SEQ ID NO: 13 и характеризующуюся наличием гомологии последовательности с геномным участком, расположенным справа и в пределах 50 азотистых оснований от целевого сайта в локусе гена B2M, где (i) фланкирована (ii) и (iii); при этом локус гена B2M расщепляется в целевом сайте, и нуклеиновая кислота, содержащая нуклеотидную последовательность, кодирующую первый толерогенный фактор, вставляется в локус гена B2M, с обеспечением таким образом нарушения гена B2M; (c) второго комплекса RNP, содержащего РНК-направляемую нуклеазу и gRNA, нацеленную на целевой сайт в локусе гена тиоредоксин-взаимодействующего белка (TXNIP); и (d) второго вектора, содержащего нуклеиновую кислоту, где нуклеиновая кислота содержит: (i) нуклеотидную последовательность, кодирующую второй толерогенный фактор; (ii) нуклеотидную последовательность, состоящую по сути из SEQ ID NO: 25 и характеризующуюся наличием гомологии последовательности с геномным участком, расположенным слева и в пределах 50 азотистых оснований от целевого сайта в локусе гена TXNIP; и (iii) нуклеотидную последовательность, состоящую по сути из SEQ ID NO: 32 и характеризующуюся наличием гомологии последовательности с геномным участком, расположенным справа и в пределах 50 азотистых оснований от целевого сайта в локусе гена TXNIP, где (i) фланкирована с помощью (ii) и (iii); где локус гена TXNIP

расщепляется в целевом сайте, и нуклеиновая кислота, содержащая нуклеотидную последовательность, кодирующую второй толерогенный фактор, вставляется в локус гена TXNIP, с обеспечением таким образом нарушения гена TXNIP и получение универсальной донорской клетки, где универсальная донорская клетка характеризуется повышенной способностью к ускользанию от иммунного ответа и/или выживаемостью клеток по сравнению с контрольной клеткой.

В другом способе, способе 85А, в настоящем изобретении предусмотрен способ в соответствии со способом 85, где нуклеиновая кислота в (b) вставлена в локус гена В2М в пределах 50 пар оснований от целевого сайта и/или где нуклеиновая кислота в (d) вставлена в локус гена TXNIP в пределах 50 пар оснований от целевого сайта.

В другом способе, способе 86, в настоящем изобретении предусмотрен способ в соответствии со способом 85, где контрольная клетка представляет собой клетку дикого типа или клетку, которая не содержит вставленную нуклеиновую кислоту.

В другом способе, способе 87, в настоящем изобретении предусмотрен способ в соответствии со способом 85, где нарушенный ген В2М характеризуется сниженной или устраненной экспрессией В2М, а нарушенный ген TXNIP характеризуется сниженной или устраненной экспрессией TXNIP.

В другом способе, способе 88, в настоящем изобретении предусмотрен способ в соответствии со способом 85, где gRNA первого комплекса RNP содержит спейсерную последовательность, соответствующую последовательности, состоящей из SEQ ID NO: 1-3 или 35-44, и gRNA второго комплекса RNP содержит спейсерную последовательность, соответствующую последовательности, состоящей из SEQ ID NO: 15-24.

В другом способе, способе 89, в настоящем изобретении предусмотрен способ в соответствии со способом 85, где gRNA первого комплекса RNP содержит спейсерную последовательность, соответствующую последовательности, состоящей из SEQ ID NO: 2, и gRNA второго комплекса RNP содержит спейсерную последовательность, соответствующую последовательности, состоящей из SEQ ID NO: 20.

В другом способе, способе 90, в настоящем изобретении предусмотрен способ в соответствии со способом 85, где первый вектор представляет собой плазмидный вектор, и второй вектор представляет собой плазмидный вектор.

В другом способе, способе 91, в настоящем изобретении предусмотрен способ в соответствии со способом 85, где первый толерогенный фактор представляет собой лиганд запрограммированной гибели 1 (PD-L1), и второй толерогенный фактор представляет собой антиген гистосовместимости HLA класса I, альфа-цепь E (HLA-E).

В другом способе, способе 92, в настоящем изобретении предусмотрен способ в соответствии со способом 91, где нуклеотидная последовательность, кодирующая PD-L1, состоит по сути из SEQ ID NO: 11.

В другом способе, способе 93, в настоящем изобретении предусмотрен способ в соответствии со способом 91, где нуклеотидная последовательность, кодирующая HLA-E, содержит последовательность, кодирующую тример HLA-E, содержащий сигнальный пептид В2М, слитый с пептидом презентации HLA-G, слитым с мембранным белком В2М, слитым с HLA-E без его сигнального пептида, и последовательность, кодирующая тример HLA-E, состоит по сути из SEQ ID NO: 55.

В другом способе, способе 94, в настоящем изобретении предусмотрен способ в соответствии со способом 85, где нуклеотидная последовательность, кодирующая первый толерогенный фактор, функционально связана с экзогенным промотором, и нуклеотидная последовательность, кодирующая второй толерогенный фактор, функционально связана с экзогенным промотором.

В другом способе, способе 95, в настоящем изобретении предусмотрен способ в соответствии со способом 94, где экзогенный промотор представляет собой промотор CMV, EF1 $\alpha$ , PGK, CAG или UBC.

В другом способе, способе 96, в настоящем изобретении предусмотрен способ в соответствии со способом 85, где каждый из первого комплекса RNP и второго комплекса RNP содержит РНК-направляемую нуклеазу и gRNA при молярном соотношении 1:3.

В другом способе, способе 97, в настоящем изобретении предусмотрен способ в соответствии со способом 85, где РНК-направляемая нуклеаза каждого из первого комплекса RNP и второго комплекса RNP представляет собой нуклеазу Cas9.

В другом способе, способе 98, в настоящем изобретении предусмотрен способ в соответствии со способом 97, где нуклеаза Cas9 связана с по меньшей мере одним сигналом ядерной локализации.

В другом способе, способе 99, в настоящем изобретении предусмотрен способ в соответствии со способом 85, где стволовая клетка представляет собой эмбриональную стволовую клетку, стволовую клетку взрослого организма, индуцированную плюрипотентную стволовую клетку или гемопоэтическую стволовую клетку.

В другом способе, способе 100, в настоящем изобретении предусмотрен способ в соответствии со способом 85, где стволовая клетка представляет собой стволовую клетку человека.

В другом способе, способе 101, в настоящем изобретении предусмотрен способ *in vitro* получения универсальной донорской клетки, при этом способ включает доставку в стволовую клетку (a) первого рибонуклеопротеинового (RNP) комплекса, содержащего РНК-направляемую нуклеазу и направляющую

РНК (gRNA), нацеленную на целевой сайт в локусе гена бета-2-микроглобулина (B2M); (b) первого вектора, содержащего нуклеиновую кислоту, где нуклеиновая кислота содержит (i) нуклеотидную последовательность, кодирующую первый толерогенный фактор; (ii) нуклеотидную последовательность, характеризующуюся наличием гомологии последовательности с геномным участком, расположенным слева и в пределах 50 азотистых оснований от целевого сайта в локусе гена B2M; и (iii) нуклеотидную последовательность, характеризующуюся наличием гомологии последовательности с геномным участком, расположенным справа и в пределах 50 азотистых оснований от целевого сайта в локусе гена B2M, где (i) фланкирована с помощью (ii) и (iii), и первый вектор содержит нуклеотидную последовательность, состоящую из SEQ ID NO: 33; при этом локус гена B2M расщепляется в целевом сайте, и нуклеиновая кислота, содержащая нуклеотидную последовательность, кодирующую первый толерогенный фактор, вставляется в локус гена B2M, с обеспечением таким образом нарушения гена B2M; (c) второго комплекса RNP, содержащего РНК-направляемую нуклеазу и gRNA, нацеленную на целевой сайт в локусе гена тиоредоксин-взаимодействующего белка (TXNIP); и (d) второго вектора, содержащего нуклеиновую кислоту, где нуклеиновая кислота содержит: (i) нуклеотидную последовательность, кодирующую второй толерогенный фактор; (ii) нуклеотидную последовательность, характеризующуюся наличием гомологии последовательности с геномным участком, расположенным слева и в пределах 50 азотистых оснований от целевого сайта в локусе гена TXNIP; и (iii) нуклеотидную последовательность, характеризующуюся наличием гомологии последовательности с геномным участком, расположенным справа и в пределах 50 азотистых оснований от целевого сайта в локусе гена TXNIP, при этом (i) фланкирована с помощью (ii) и (iii), и второй вектор, который содержит нуклеотидную последовательность, состоящую из SEQ ID NO: 34 или 56; при этом локус гена TXNIP расщепляется в целевом сайте, и нуклеиновая кислота, содержащая нуклеотидную последовательность, кодирующую второй толерогенный фактор, вставляется в локус гена TXNIP, с обеспечением таким образом нарушения гена TXNIP и получение универсальной донорской клетки, где универсальная донорская клетка характеризуется повышенной способностью к ускользанию от иммунного ответа и/или выживаемостью клеток по сравнению с контрольной клеткой.

В другом способе, способе 101A, в настоящем изобретении предусмотрен способ в соответствии со способом 101, где нуклеиновая кислота в (b) вставлена в локус гена B2M в пределах 50 пар оснований от целевого сайта и/или где нуклеиновая кислота в (d) вставлена в локус гена TXNIP в пределах 50 пар оснований от целевого сайта.

В другом способе, способе 102, в настоящем изобретении предусмотрен способ в соответствии со способом 101, где контрольная клетка представляет собой клетку дикого типа или клетку, которая не содержит вставленную нуклеиновую кислоту.

В другом способе, способе 103, в настоящем изобретении предусмотрен способ в соответствии со способом 10, где нарушенный ген B2M характеризуется сниженной или устраненной экспрессией B2M, а нарушенный ген TXNIP характеризуется сниженной или устраненной экспрессией TXNIP.

В другом способе, способе 104, в настоящем изобретении предусмотрен способ в соответствии со способом 101, где gRNA первого комплекса RNP содержит спейсерную последовательность, соответствующую последовательности, состоящей из SEQ ID NO: 1-3 или 35-44, и gRNA второго комплекса RNP содержит спейсерную последовательность, соответствующую последовательности, состоящей из SEQ ID NO: 15-24.

В другом способе, способе 105, в настоящем изобретении предусмотрен способ в соответствии со способом 101, где gRNA первого комплекса RNP содержит спейсерную последовательность, соответствующую последовательности, состоящей из SEQ ID NO: 2, и gRNA второго комплекса RNP содержит спейсерную последовательность, соответствующую последовательности, состоящей из SEQ ID NO: 20.

В другом способе, способе 106, в настоящем изобретении предусмотрен способ в соответствии со способом 101, где первый вектор представляет собой плазмидный вектор, и второй вектор представляет собой плазмидный вектор.

В другом способе, способе 107, в настоящем изобретении предусмотрен способ в соответствии со способом 101, где первый толерогенный фактор представляет собой лиганд запрограммированной гибели 1 (PD-L1), и второй толерогенный фактор представляет собой антиген гистосовместимости HLA класса I, альфа-цепь E (HLA-E).

В другом способе, способе 108, в настоящем изобретении предусмотрен способ в соответствии со способом 101, где каждый из первого комплекса RNP и второго комплекса RNP содержит РНК-направляемую нуклеазу и gRNA при молярном соотношении 1:3.

В другом способе, способе 109, в настоящем изобретении предусмотрен способ в соответствии со способом 101, где РНК-направляемая нуклеаза каждого из первого комплекса RNP и второго комплекса RNP представляет собой нуклеазу Cas9.

В другом способе, способе 110, в настоящем изобретении предусмотрен способ в соответствии со способом 109, где нуклеаза Cas9 связана с по меньшей мере одним сигналом ядерной локализации.

В другом способе, способе 111, в настоящем изобретении предусмотрен способ в соответствии со

способом 101, где стволовая клетка представляет собой эмбриональную стволовую клетку, стволовую клетку взрослого организма, индуцированную плюрипотентную стволовую клетку или гемопоэтическую стволовую клетку.

В другом способе, способе 112, в настоящем изобретении предусмотрен способ в соответствии со способом 101, где стволовая клетка представляет собой стволовую клетку человека.

В первом процессе, процессе 1, в настоящем изобретении предусмотрен процесс получения универсальных донорских клеток, при этом процесс включает (a) модификацию стволовых клеток путем вставки нуклеотидной последовательности, кодирующей лиганд запрограммированной гибели 1 (PD-L1), в пределах гена, кодирующего бета-2-микроглобулин (B2M), или рядом с ним, с обеспечением таким образом получения PD-L1-положительных клеток; (b) обеспечение обогащения в отношении PD-L1-положительных клеток; (c) модификацию PD-L1-положительных клеток из (b) путем вставки нуклеотидной последовательности, кодирующей антиген гистосовместимости HLA класса I, альфа-цепь E (HLA-E), в пределах гена, кодирующего тиоредоксин-взаимодействующий белок (TXNIP), или рядом с ним, с обеспечением таким образом получения дважды положительных клеток, положительных по PD-L1 и HLA-E; (d) обеспечение обогащения в отношении дважды положительных клеток, положительных по PD-L1 и HLA-E; (e) сортировку отдельных клеток для отбора дважды положительных клеток, положительных по PD-L1 и HLA-E; (f) определение характеристик клеток из (e) в качестве универсальных донорских клеток; и (g) замораживание универсальных донорских клеток для длительного хранения.

В другом процессе, процессе 2, в настоящем изобретении предусмотрен процесс в соответствии с процессом 1, где модификация в (a) предусматривает доставку в стволовые клетки (1) первого рибонуклеопротеинового (RNP) комплекса, содержащего РНК-направляемую нуклеазу и направляющую РНК (gRNA), нацеленную на целевой сайт в локусе гена B2M; и (2) первого вектора, содержащего нуклеиновую кислоту, где нуклеиновая кислота содержит (i) нуклеотидную последовательность, гомологичную участку, расположенному слева от целевого сайта в локусе гена B2M, (ii) нуклеотидную последовательность, кодирующую PD-L1, и (iii) нуклеотидную последовательность, гомологичную участку, расположенному справа от целевого сайта в локусе гена B2M, где локус гена B2M расщепляется в целевом сайте, и нуклеиновая кислота, содержащая нуклеотидную последовательность, кодирующую PD-L1, вставляется в локус гена B2M, с обеспечением таким образом нарушения гена B2M.

В другом процессе, процессе 2A, в настоящем изобретении предусмотрен способ в соответствии с процессом 2, где нуклеиновая кислота вставляется в локус гена B2M в пределах 50 пар оснований от целевого сайта.

В другом процессе, процессе 3, в настоящем изобретении предусмотрен процесс в соответствии с процессом 2, где РНК-направляемая нуклеаза первого комплекса RNP представляет собой нуклеазу Cas9, и gRNA первого комплекса RNP содержит спейсерную последовательность, соответствующую целевой последовательности, состоящей из SEQ ID NO: 2.

В другом процессе, процессе 4, в настоящем изобретении предусмотрен процесс в соответствии с процессом 3, где нуклеаза Cas9 связана с по меньшей мере одним сигналом ядерной локализации.

В другом процессе, процессе 5, в настоящем изобретении предусмотрен процесс в соответствии с процессом 2, где первый RNP содержит gRNA и РНК-направляемую нуклеазу при молярном соотношении 3:1.

В другом процессе, процессе 6, в настоящем изобретении предусмотрен процесс в соответствии с процессом 2, где нуклеотидная последовательность из (a) (2) (i) состоит по сути из SEQ ID NO: 7, и нуклеотидная последовательность из (a) (2) (iii) состоит по сути из SEQ ID NO: 13.

В другом процессе, процессе 7, в настоящем изобретении предусмотрен процесс в соответствии с процессом 2, где нуклеотидная последовательность, кодирующая PD-L1, состоит по сути из SEQ ID NO: 11.

В другом процессе, процессе 8, в настоящем изобретении предусмотрен процесс в соответствии с процессом 2, где нуклеотидная последовательность, кодирующая PD-L1, функционально связана с промотором CAG.

В другом процессе, процессе 9, в настоящем изобретении предусмотрен процесс в соответствии с процессом 2, где первый вектор представляет собой плазмидный вектор и содержит нуклеотидную последовательность, состоящую из SEQ ID NO: 33.

В другом процессе, процессе 10, в настоящем изобретении предусмотрен процесс в соответствии с процессом 2, где доставка в (a) (1) и (a) (2) предусматривает электропорацию.

В другом процессе, процессе 11, в настоящем изобретении предусмотрен процесс в соответствии с процессом 1, где обеспечение обогащения в отношении PD-L1-положительных клеток в (b) предусматривает сортировку клеток на основе магнитного взаимодействия (MACS), клонирование отдельных клеток, обеспечение размножения указанных PD-L1-положительных клеток или их комбинацию.

В другом процессе, процессе 12, в настоящем изобретении предусмотрен процесс в соответствии с процессом 1, где модификация в (c) предусматривает доставку в PD-L1-положительные клетки (1) второго комплекса RNP, содержащего РНК-направляемую нуклеазу и gRNA, нацеленную на целевой сайт в локусе гена TXNIP; и (2) второго вектора, содержащего нуклеиновую кислоту, где нуклеиновая кислота содержит (i) нуклеотидную последовательность, гомологичную участку, расположенному слева

от целевого сайта в локусе гена TXNIP, (ii) нуклеотидную последовательность, кодирующую HLA-E, и (iii) нуклеотидную последовательность, гомологичную участку, расположенному справа от целевого сайта в локусе гена TXNIP, где локус гена TXNIP расщепляется в целевом сайте, и нуклеиновая кислота, содержащая нуклеотидную последовательность, кодирующую HLA-E, вставляется в локус гена TXNIP, с обеспечением таким образом нарушения гена TXNIP.

В другом процессе, процессе 12А, в настоящем изобретении предусмотрен способ в соответствии с процессом 12, где нуклеиновая кислота вставляется в локус гена TXNIP в пределах 50 пар оснований от целевого сайта.

В другом процессе, процессе 13, в настоящем изобретении предусмотрен процесс в соответствии с процессом 12, где РНК-направляемая нуклеаза второго комплекса RNP представляет собой нуклеазу Cas9, и gRNA второго комплекса RNP содержит спейсерную последовательность, соответствующую целевой последовательности, состоящей из SEQ ID NO: 20.

В другом процессе, процессе 14, в настоящем изобретении предусмотрен процесс в соответствии с процессом 13, где нуклеаза Cas9 связана с по меньшей мере одним сигналом ядерной локализации.

В другом процессе, процессе 15, в настоящем изобретении предусмотрен процесс в соответствии с процессом 12, где второй RNP содержит gRNA и РНК-направляемую нуклеазу при молярном соотношении 3:1.

В другом процессе, процессе 16, в настоящем изобретении предусмотрен процесс в соответствии с процессом 12, где нуклеотидная последовательность из (с) (2) (i) состоит по сути из SEQ ID NO: 25, и нуклеотидная последовательность из (с) (2) (iii) состоит по сути из SEQ ID NO: 32.

В другом процессе, процессе 17, в настоящем изобретении предусмотрен процесс в соответствии с процессом 12, где нуклеотидная последовательность, кодирующая HLA-E, содержит последовательность, кодирующую тример HLA-E, содержащий сигнальный пептид В2М, слитый с пептидом презентации HLA-G, слитым с мембранным белком В2М, слитым с HLA-E без его сигнального пептида.

В другом процессе, процессе 18, в настоящем изобретении предусмотрен процесс в соответствии с процессом 17, где последовательность, кодирующая тример HLA-E, состоит по сути из SEQ ID NO: 55.

В другом процессе, процессе 19, в настоящем изобретении предусмотрен процесс в соответствии с процессом 12, где нуклеотидная последовательность, кодирующая HLA-E, функционально связана с промотором СAG.

В другом процессе, процессе 20, в настоящем изобретении предусмотрен процесс в соответствии с процессом 12, где второй вектор представляет собой плазмидный вектор и содержит нуклеотидную последовательность, состоящую из SEQ ID NO: 34 или 56.

В другом процессе, процессе 21, в настоящем изобретении предусмотрен процесс в соответствии с процессом 12, где доставка в (с) (1) и (с) (2) предусматривает электропорацию.

В другом процессе, процессе 22, в настоящем изобретении предусмотрен процесс в соответствии с процессом 1, где обеспечение обогащения в отношении дважды положительных клеток, положительных по PD-L1 и HLA-E, в (d) включает сортировку клеток на основе магнитного взаимодействия, клонирование отдельных клеток, обеспечение размножения указанных дважды положительных клеток, положительных по PD-L1 и HLA-E, или их комбинацию.

В другом способе, способе 23, в настоящем изобретении предусмотрен способ в соответствии с способом 1, где сортировка отдельных клеток в (е) предусматривает сортировку клеток с активированной флуоресценцией (FACS), клонирование отдельных клеток, обеспечение размножения указанных клеток, отсортированных по одной клетке, или их комбинацию.

В другом процессе, процессе 24, в настоящем изобретении предусмотрен процесс в соответствии с процессом 1, где определение характеристик в (f) предусматривает анализ ДНК на зиготность и/или профиль инсерционно-делеционных мутаций.

В другом процессе, процессе 25, в настоящем изобретении предусмотрен процесс в соответствии с процессом 1, где определение характеристик в (f) предусматривает анализы клеток на морфологию, жизнеспособность, кариотипирование, уровни эндотоксинов, уровни микоплазмы, анализ целевого/нецелевого воздействия, случайную вставку вектора, остаточную Cas9, остаточный вектор, статус плюрипотентности, способность к дифференцировке или их комбинацию.

В другом процессе, процессе 26, в настоящем изобретении предусмотрен процесс в соответствии с процессом 1, где процесс дополнительно включает замораживание перед определением характеристик в (f).

В другом процессе, процессе 27, в настоящем изобретении предусмотрен процесс в соответствии с процессом 1, дополнительно предусматривающий в (а) обеспечение размножения полученных PD-L1-положительных клеток, в (с) обеспечение размножения полученных дважды положительных клеток, положительных по PD-L1 и HLA-E, в (е) обеспечение размножения отобранных дважды положительных клеток, положительных по PD-L1 и HLA-E, или их комбинацию.

В другом процессе, процессе 28, в настоящем изобретении предусмотрен процесс получения универсальных донорских клеток, при этом процесс включает (а) модификацию стволовых клеток путем вставки нуклеотидной последовательности, кодирующей первый толерогенный фактор, в пределах гена, кодирующего человеческий лейкоцитарный антиген МНС-I или МНС-II, или компонент, или регулятор

транскрипции комплекса МНС-I или МНС-II, или рядом с ним, с обеспечением таким образом получения клеток, положительных по первому толерогенному фактору; (b) обеспечение обогащения в отношении клеток, положительных по первому толерогенному фактору; (c) модификацию клеток, положительных по первому толерогенному фактору, из (b) путем вставки нуклеотидной последовательности, кодирующей второй толерогенный фактор, в пределах гена, кодирующего фактор выживания, или рядом с ним, с обеспечением таким образом получения клеток, положительных по первому толерогенному фактору/положительных по второму толерогенному фактору; (d) обеспечение обогащения в отношении клеток, положительных по первому толерогенному фактору/положительных по второму толерогенному фактору; (e) сортировку отдельных клеток для отбора клеток, положительных по первому толерогенному фактору/положительных по второму толерогенному фактору; (f) определение характеристик клеток из (e) в качестве универсальных донорских клеток; и (g) замораживание универсальных донорских клеток для длительного хранения.

В другом процессе, процессе 29 по настоящему изобретению представлен процесс в соответствии с процессом 28, где обеспечение обогащения в отношении клеток, положительных по первому толерогенному фактору, в (b) включает сортировку клеток на основе магнитного взаимодействия (MACS), клонирование отдельных клеток, обеспечение размножения указанных клеток, положительных по первому толерогенному фактору, или их комбинацию.

В другом процессе, процессе 30, в настоящем изобретении предусмотрен процесс в соответствии с процессом 28 или 29, где обеспечение обогащения в отношении клеток, положительных по первому толерогенному фактору/положительных по второму толерогенному фактору, в (d) включает сортировку клеток на основе магнитного взаимодействия (MACS), клонирование отдельных клеток, обеспечение размножения указанных клеток, положительных по первому толерогенному фактору/положительных по второму толерогенному фактору, или их комбинацию.

В другом процессе, процессе 31, в настоящем изобретении предусмотрен процесс в соответствии с любым из процессов 28-30, дополнительно включающий в (a) обеспечение размножения полученных клеток, положительных по первому толерогенному фактору, в (c) обеспечение размножения полученных клеток, положительных по первому толерогенному фактору/положительных по второму толерогенному фактору, в (e) обеспечение размножения отобранных клеток, положительных по первому толерогенному фактору/положительных по второму толерогенному фактору, или их комбинацию.

В другом процессе, процессе 32, в настоящем изобретении предусмотрен процесс в соответствии с любым из процессов 28-31, где модификация в (a) предусматривает доставку в стволовые клетки (1) первой РНК-направляемой нуклеазы и первой направляющей РНК (gRNA), нацеленной на целевой сайт в локусе гена человеческого лейкоцитарного антигена МНС-I или МНС-II или компонента или регулятора транскрипции комплекса МНС-I или МНС-II; и (2) первого вектора, содержащего первую нуклеиновую кислоту, при этом первая нуклеиновая кислота содержит (i) нуклеотидную последовательность, гомологичную участку, расположенному слева от целевого сайта в локусе гена человеческого лейкоцитарного антигена МНС-I или МНС-II или компонента или регулятора транскрипции комплекса МНС-I или МНС-II, (ii) нуклеотидную последовательность, кодирующую первый толерогенный фактор, и (iii) нуклеотидную последовательность, гомологичную участку, расположенному справа от целевого сайта в локусе гена человеческого лейкоцитарного антигена МНС-I или МНС-II или компонента или регулятора транскрипции комплекса МНС-I или МНС-II, где локус гена человеческого лейкоцитарного антигена МНС-I или МНС-II или компонента или регулятора транскрипции комплекса МНС-I или МНС-II расщепляется в целевом сайте и первая нуклеиновая кислота, содержащая нуклеотидную последовательность, кодирующую первый толерогенный фактор, вставляется в локус гена человеческого лейкоцитарного антигена МНС-I или МНС-II или компонента или регулятора транскрипции комплекса МНС-I или МНС-II, с обеспечением таким образом нарушения гена человеческого лейкоцитарного антигена МНС-I или МНС-II или компонента или регулятора транскрипции комплекса МНС-I или МНС-II.

В другом процессе, процессе 32A, в настоящем изобретении предусмотрен способ в соответствии с процессом 32, где нуклеиновая кислота вставляется в локус гена человеческого лейкоцитарного антигена МНС-I или МНС-II или компонента или регулятора транскрипции комплекса МНС-I или МНС-II в пределах 50 пар оснований от целевого сайта.

В другом процессе, процессе 33, в настоящем изобретении предусмотрен процесс в соответствии с процессом 32, где первая РНК-направляемая нуклеаза и первая gRNA образуют первый рибонуклеопротеиновый (RNP) комплекс.

В другом процессе, процессе 34, в настоящем изобретении предусмотрен процесс в соответствии с любым из процессов 28-33, где модификация в (a) предусматривает доставку в стволовые клетки (1) первого рибонуклеопротеинового (RNP) комплекса, содержащего первую РНК-направляемую нуклеазу и первую направляющую РНК (gRNA), нацеленную на целевой сайт в локусе гена человеческого лейкоцитарного антигена МНС-I или МНС-II или компонента или регулятора транскрипции комплекса МНС-I или МНС-II, и (2) первого вектора, содержащего первую нуклеиновую кислоту, при этом первая нуклеиновая кислота содержит (i) нуклеотидную последовательность,

гомологичную участку, расположенному слева от целевого сайта в локусе гена человеческого лейкоцитарного антигена МНС-I или МНС-II или компонента или регулятора транскрипции комплекса МНС-I или МНС-II, (ii) нуклеотидную последовательность, кодирующую первый толерогенный фактор, и (iii) нуклеотидную последовательность, гомологичную участку, расположенному справа от целевого сайта в локусе гена человеческого лейкоцитарного антигена МНС-I или МНС-II или компонента или регулятора транскрипции комплекса МНС-I или МНС-II, где локус гена человеческого лейкоцитарного антигена МНС-I или МНС-II или компонента или регулятора транскрипции комплекса МНС-I или МНС-II расщепляется в целевом сайте и первая нуклеиновая кислота, содержащая нуклеотидную последовательность, кодирующую первый толерогенный фактор, вставляется в локус гена человеческого лейкоцитарного антигена МНС-I или МНС-II или компонента или регулятора транскрипции комплекса МНС-I или МНС-II, с обеспечением таким образом нарушения гена человеческого лейкоцитарного антигена МНС-I или МНС-II или компонента или регулятора транскрипции комплекса МНС-I или МНС-II.

В другом процессе, процессе 34А, в настоящем изобретении предусмотрен способ в соответствии с процессом 34, где нуклеиновая кислота вставляется в локус гена человеческого лейкоцитарного антигена МНС-I или МНС-II или компонента или регулятора транскрипции комплекса МНС-I или МНС-II в пределах 50 пар оснований от целевого сайта.

В другом процессе, процессе 35, в настоящем изобретении предусмотрен процесс в соответствии с любым из процессов 28-34, где ген человеческого лейкоцитарного антигена МНС-I или МНС-II или компонента или регулятора транскрипции комплекса МНС-I или МНС-II представляет собой HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DP, HLA-DM, HLA-DOA, HLA-DOB, HLA-DQ, HLA-DR, B2M, NLRC5, СPТА, RFX5, RFXAP или RFXANK.

В другом процессе, процессе 36, в настоящем изобретении предусмотрен процесс в соответствии с любым из процессов 28-35, где ген человеческого лейкоцитарного антигена МНС-I или МНС-II или компонента или регулятора транскрипции комплекса МНС-I или МНС-II представляет собой B2M.

В другом процессе, процессе 37, в настоящем изобретении предусмотрен процесс в соответствии с процессом 36, где нуклеотидная последовательность из (а) (2) (i) состоит по сути из SEQ ID NO: 7, и нуклеотидная последовательность из (а) (2) (iii) состоит по сути из SEQ ID NO: 13.

В другом процессе, процессе 38, в настоящем изобретении предусмотрен процесс в соответствии с процессами 36 или 37, где первая gRNA содержит спейсерную последовательность, соответствующую целевой последовательности, состоящей из SEQ ID NO: 2.

В другом процессе, процессе 39, в настоящем изобретении предусмотрен процесс в соответствии с любым из процессов 32-38, где первая РНК-направляемая нуклеаза представляет собой нуклеазу Cas9.

В другом процессе, процессе 40, в настоящем изобретении предусмотрен процесс в соответствии с процессом 39, где нуклеаза Cas9 связана с по меньшей мере одним сигналом ядерной локализации.

В другом процессе, процессе 41, в настоящем изобретении предусмотрен процесс в соответствии с любым из процессов 32-40, где первый RNP содержит первую gRNA и первую РНК-направляемую нуклеазу при молярном соотношении 3:1.

В другом процессе, процессе 42, в настоящем изобретении предусмотрен процесс в соответствии с любым из процессов 28-41, где первый толерогенный фактор представляет собой PD-L1, HLA-E, HLA-G, CTLA-4 или CD47.

В другом процессе, процессе 43, в настоящем изобретении предусмотрен процесс в соответствии с любым из процессов 28-42, где нуклеотидная последовательность, кодирующая первый толерогенный фактор, функционально связана с экзогенным промотором.

В другом процессе, процессе 44, в настоящем изобретении предусмотрен процесс в соответствии с процессом 43, где экзогенный промотор представляет собой промотор CMV, EF1 $\alpha$ , PGK, CAG или UBC.

В другом процессе, процессе 45, в настоящем изобретении предусмотрен процесс в соответствии с любым из процессов 28-44, где первый толерогенный фактор представляет собой PD-L1.

В другом процессе, процессе 46, в настоящем изобретении предусмотрен процесс в соответствии с процессом 45, где нуклеотидная последовательность, кодирующая PD-L1, состоит по сути из SEQ ID NO: 11.

В другом процессе, процессе 47, в настоящем изобретении предусмотрен процесс в соответствии с процессом 46, где нуклеотидная последовательность, кодирующая PD-L1, функционально связана с промотором CAG.

В другом процессе, процессе 48, в настоящем изобретении предусмотрен процесс в соответствии с любым из процессов 45-47, где первый вектор содержит нуклеотидную последовательность, состоящую из SEQ ID NO: 33.

В другом процессе, процессе 49, в настоящем изобретении предусмотрен процесс в соответствии с любым из процессов 28-48, где модификация в (с) предусматривает доставку в стволовые клетки (1) второй РНК-направляемой нуклеазы и второй направляющей РНК (gRNA), нацеленной на целевой сайт в локусе гена фактора выживания; и (2) второго вектора, содержащего вторую нуклеиновую кислоту, где вторая нуклеиновая кислота содержит (i) нуклеотидную последовательность, гомологичную

участку, расположенному слева от целевого сайта в локусе гена фактора выживания, (ii) нуклеотидную последовательность, кодирующую второй толерогенный фактор, и (iii) нуклеотидную последовательность, гомологичную участку, расположенному справа от целевого сайта в локусе гена фактора выживания, где локус гена фактора выживания расщепляется в целевом сайте и вторая нуклеиновая кислота, содержащая нуклеотидную последовательность, кодирующую второй толерогенный фактор, вставляется в локус гена фактора выживания, с обеспечением таким образом нарушения гена фактора выживания.

В другом процессе, процессе 49А, в настоящем изобретении предусмотрен способ в соответствии с процессом 49, где нуклеиновая кислота вставляется в локус гена фактора выживания в пределах 50 пар оснований от целевого сайта.

В другом процессе, процессе 50, в настоящем изобретении предусмотрен процесс в соответствии с процессом 49, где вторая РНК-направляемая нуклеаза и вторая gRNA образуют второй рибонуклеопротеиновый (RNP) комплекс.

В другом процессе, процессе 51, в настоящем изобретении предусмотрен процесс в соответствии с любым из процессов 28-48, где модификация в (с) предусматривает доставку в клетки, положительные по первому толерогенному фактору, (1) второго рибонуклеопротеинового (RNP) комплекса, содержащего вторую РНК-направляемую нуклеазу и вторую направляющую РНК (gRNA), нацеленную на целевой сайт в локусе гена фактора выживания; и (2) второго вектора, содержащего вторую нуклеиновую кислоту, где вторая нуклеиновая кислота содержит (i) нуклеотидную последовательность, гомологичную участку, расположенному слева от целевого сайта в локусе гена фактора выживания, (ii) нуклеотидную последовательность, кодирующую второй толерогенный фактор, и (iii) нуклеотидную последовательность, гомологичную участку, расположенному справа от целевого сайта в локусе гена второго фактора выживания, где локус гена фактора выживания расщепляется в целевом сайте и вторая нуклеиновая кислота, содержащая нуклеотидную последовательность, кодирующую второй толерогенный фактор, вставляется в локус гена фактора выживания, с обеспечением таким образом нарушения гена фактора выживания.

В другом процессе, процессе 51А, в настоящем изобретении предусмотрен способ в соответствии с процессом 51, где нуклеиновая кислота вставляется в локус гена фактора выживания в пределах 50 пар оснований от целевого сайта.

В другом процессе, процессе 52, в настоящем изобретении предусмотрен процесс в соответствии с любым из процессов 28-51, где ген выживания представляет собой TXNIP, ZNF143, FOXO1, JNK или MANF.

В другом процессе, процессе 53, в настоящем изобретении предусмотрен процесс в соответствии с процессом 52, где ген выживания представляет собой TXNIP.

В другом процессе, процессе 54, в настоящем изобретении предусмотрен процесс в соответствии с процессом 53, где вторая gRNA содержит спейсерную последовательность, соответствующую целевой последовательности, состоящей из SEQ ID NO: 20.

В другом процессе, процессе 55, в настоящем изобретении предусмотрен процесс в соответствии с процессом 52 или 53, где нуклеотидная последовательность из (с) (2) (i) состоит по сути из SEQ ID NO: 25, и нуклеотидная последовательность из (с) (2) (iii) состоит по сути из SEQ ID NO: 32.

В другом процессе, процессе 56, в настоящем изобретении предусмотрен процесс в соответствии с любым из процессов 49-55, где вторая РНК-направляемая нуклеаза представляет собой нуклеазу Cas9.

В другом процессе, процессе 57, в настоящем изобретении предусмотрен процесс в соответствии с процессом 56, где нуклеаза Cas9 связана с по меньшей мере одним сигналом ядерной локализации.

В другом процессе, процессе 58,, в настоящем изобретении предусмотрен процесс в соответствии с любым из процессов 49-57, где второй RNP содержит вторую gRNA и вторую РНК-направляемую нуклеазу при молярном соотношении 3:1.

В другом процессе, процессе 59, в настоящем изобретении предусмотрен процесс в соответствии с любым из процессов 49-58, где второй толерогенный фактор представляет собой PD-L1, HLA-E, HLA-G, CTLA-4 или CD47.

В другом процессе, процессе 60, в настоящем изобретении предусмотрен процесс в соответствии с любым из процессов 28-59, где нуклеотидная последовательность, кодирующая второй толерогенный фактор, функционально связана с экзогенным промотором.

В другом процессе, процессе 61 по настоящему изобретению представлен процесс в соответствии с процессом 60, где экзогенный промотор представляет собой промотор CMV, EF1 $\alpha$ , PGK, CAG или UBC.

В другом процессе, процессе 62, в настоящем изобретении предусмотрен процесс в соответствии с любым из процессов 28-61, где второй толерогенный фактор представляет собой HLA-E.

В другом процессе, процессе 63, в настоящем изобретении предусмотрен процесс в соответствии с процессом 62, где нуклеотидная последовательность, кодирующая HLA-E, содержит последовательность, кодирующую тример HLA-E, содержащий сигнальный пептид B2M, слитый с пептидом презентации HLA-G, слитым с мембранным белком B2M, слитым с HLA-E без его сигнального пептида.

В другом процессе, процессе 64, в настоящем изобретении предусмотрен процесс в соответствии с процессом 63, где последовательность, кодирующая тример HLA-E, состоит по сути из SEQ ID NO: 55.

В другом процессе, процессе 65 по настоящему изобретению представлен процесс в соответствии с процессом 63 или 64, где нуклеотидная последовательность, кодирующая HLA-E, функционально связана с промотором CAG.

В другом процессе, процессе 66, в настоящем изобретении предусмотрен процесс в соответствии с любым из процессов 62-65, где второй вектор содержит нуклеотидную последовательность, состоящую из SEQ ID NO: 34 или 56.

В другом способе, способе 67, в настоящем изобретении предусмотрен способ в соответствии с любым из способов 28-66, где сортировка отдельных клеток в (e) предусматривает сортировку клеток с активированной флуоресценцией (FACS), клонирование отдельных клеток, обеспечение размножения указанных клеток, отсортированных по одной клетке, или их комбинацию.

В другом процессе, процессе 68, в настоящем изобретении предусмотрен процесс в соответствии с любым из процессов 28-67, где определение характеристик в (f) предусматривает анализ ДНК на зиготность и/или профиль инсерционно-делеционных мутаций.

В другом процессе, процессе 69, в настоящем изобретении предусмотрен процесс в соответствии с любым из процессов 28-68, где определение характеристик в (f) предусматривает анализы клеток на морфологию, жизнеспособность, кариотипирование, уровни эндотоксинов, уровни микоплазмы, анализ целевого/нецелевого воздействия, случайную вставку вектора, остаточную Cas9, остаточный вектор, статус плюрипотентности, способность к дифференцировке или их комбинацию.

В другом процессе, процессе 70, в настоящем изобретении предусмотрен процесс в соответствии с любым из процессов 28-69, где процесс дополнительно включает замораживание перед определением характеристик в (f).

#### VII. Примеры.

В приведенных ниже примерах описываются создание и определение характеристик конкретных универсальных донорских клеток согласно настоящему изобретению.

##### Пример 1. Поддержание и обеспечение размножения клеток.

Поддержание hESC/hiPSC. Клетки линии СуТ49 эмбриональных стволовых клеток человека (запатентованная линия клеток hES, ViaCyte, Inc., Сан-Диего, Калифорния) поддерживали, культивировали, высевали, обеспечивали их пролиферацию и высевали, как описано в Schulz et al. (2012), PLoS ONE, 7(5):e37004. Клетки СуТ49 диссоциировали с использованием ACCUTASE® (Stemcell Technologies 07920 или эквивалент).

Человеческие индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (hiPSC), такие как линия клеток TC1133 (Lonza), поддерживали в StemFlex Complete (Life Technologies, A3349401) на планшетах для культивирования тканей, покрытых BIOLAMININ 521 CTG (BioLamina, № по каталогу CT521). Планшеты предварительно покрывали разбавлением BIOLAMININ в DPBS, кальция, магнии (Life Technologies, 14040133) 1:10 или 1:20 в течение 2 ч при 37°C. Клетки ежедневно подпитывали средой StemFlex. Для пересева клеток использовали те же плотности клеток, что и для СуТ49. Для высевания клеток в виде отдельных клеток клетки высевали с 1% добавкой RevitaCell™ (100X) (ThermoFisher, № по каталогу A2644501) в StemFlex на планшеты, покрытые BIOLAMININ.

Клонирование отдельных клеток hPSC. Для клонирования отдельных клеток hPSC (hESC или hiPSC) подпитывали с помощью StemFlex Complete с Revitacell (до конечной концентрации 1X Revitacell) за 3-4 ч до диссоциации с помощью ACCUTASE®. После диссоциации клетки сортировали, помещая одну клетку на лунку 96-луночного планшета для культуры ткани, покрытого BIOLAMININ. Устройство для FACS-сортировки WOLF (Nanocollect) использовался для сортировки отдельных клеток в лунки. Планшеты предварительно заполняли 100-200 мкл StemFlex Complete с Revitacell. Через три дня после посева клеток в клетки подпитывали свежей StemFlex и продолжали подпитывать через день 100-200 мкл среды. После 10 дней роста клетки ежедневно подпитывали StemFlex до дня 12-14. В этот момент времени в планшетах осуществляли диссоциацию с помощью ACCUTASE® и собранные клеточные суспензии разделяли 1:2, при этом половину помещали в новый 96-луночный планшет для поддержания, и половину - в раствор для экстракции ДНК QuickExtract™ DNA Extraction Solution (Lucigen). После экстракции ДНК проводили ПЦР для оценки присутствия или отсутствия необходимых редактированных генов в целевом локусе ДНК. Секвенирование по Сэнгеру использовали для подтверждения наличия необходимых редактированных генов.

Обеспечение размножения полученных из отдельной клетки клонов hPSC. Для СуТ49 (ViaCyte) успешно нацеленные клоны высевали в 24-луночные планшеты с чистой 10% средой XF KSR A10H10, но на планшеты, покрытые BIOLAMININ. После 24-луночной стадии клоны СуТ49 высевали, как описано в Schulz et al. (2012), PLoS ONE, 7(5):e37004.

Для hiPSC (TC1133) клетки поддерживали в StemFlex Complete на протяжении всего процесса клонирования и регулярного поддержания в планшетах, покрытых BIOLAMININ, с Revitacell на стадиях посева.

##### Пример 2. Создание человеческих плюрипотентных стволовых клеток (hPSC) с нокаутом (KO) B2M.

Отбор направляющей РНК (gRNA) для B2M в hPSC. Для нацеливания на экзон 1 кодирующей последовательности B2M были разработаны три gRNA, нацеленные на B2M. Эти gRNA

характеризовались низкими прогнозируемыми показателями отклонения от цели на основе предсказания гомологии последовательностей с использованием программного обеспечения для разработки gRNA. Последовательности-мишени gRNA представлены в табл. 1. gRNA содержит последовательность РНК, соответствующую целевой последовательности ДНК.

Таблица 1

Целевые последовательности gRNA для B2M			
Название	Целевая последовательность (5'-3')	SEQ ID NO:	PAM
gRNA для B2M-1 (Exon 1_T12)	GCTACTCTCTTTCTGGCC	1	TGG
gRNA для B2M-2 (Exon 1_T2)	GGCCGAGATGTCTCGCTCCG	2	TGG
gRNA для B2M-3 (Exon 1_T8)	CGCGAGCACAGCTAAGGCCA	3	CGG
Exon 1_T1	TATAAGTGGAGGCGTCGCGC	35	TGG
Exon 1_T3	GAGTAGCGCGAGCACAGCTA	36	AGG
Exon 1_T4	ACTGGACGCGTCGCGCTGGC	37	GGG
Exon 1_T5	AAGTGGAGGCGTCGCGCTGG	38	CGG
Exon 1_T6	GGCCACGGAGCGAGACATCT	39	CGG
Exon 1_T7	GCCCGAATGCTGTCACTTC	40	AGG
Exon 1_T9	CTCGCGCTACTCTCTTTTC	41	TGG
Exon 1_T10	TCCTGAAGCTGACAGCATTC	42	GGG
Exon 1_T11	TTCCTGAAGCTGACAGCATT	43	CGG
Exon 1_T13	ACTCTCTCTTTCTGGCCTGG	44	AGG

Чтобы оценить их эффективность разрезания в hPSC, клетки СуТ49 (запатентованная линия клеток hES ViaCyte) подвергали электропорации с использованием системы для электропорации Neon (система для трансфекции Neon от ThermoFisher, № по каталогу МРК5000) со смесью рибонуклеопротеина (RNP) из белка Cas9 (Biomay) и направляющей РНК (Synthego) (см. последовательности gRNA в табл. 3) при молярном соотношении 3:1 (gRNA:Cas9) с абсолютными значениями 125 пмоль Cas9 и 375 пмоль gRNA. Для образования комплекса RNP gRNA и Cas9 объединяли в одном сосуде с R-буфером (набор 100 мкл системы для трансфекции Neon от ThermoFisher, № по каталогу МРК10096) до суммарного объема 25 мкл и инкубировали в течение 15 мин при к. т. Клетки диссоциировали с использованием ACCUTASE®, затем повторно суспендировали в среде DMEM/F12 (Gibco, № по каталогу 11320033), подсчитывали с использованием NC-200 (Chemometec) и центрифугировали. Всего  $1 \times 10^6$  клеток повторно суспендировали с комплексом RNP и добавляли R-буфер до суммарного объема 125 мкл. Затем эту смесь подвергали электропорации с помощью 2 импульсов в течение 30 мс при 1100 В. После электропорации клетки переносили пипеткой в пробирку Eppendorf, заполненную средой StemFlex с RevitaCell. Эту клеточную суспензию затем высевали в чашки для культуры тканей, предварительно покрытые BIOLAMININ 521 CTG при разбавлении 1:20. Клетки культивировали в инкубаторе при нормоксии (37°C, 8% CO<sub>2</sub>) в течение 48 ч. Через 48 ч геномную ДНК собирали из клеток с использованием QuickExtract (Lucigen, Миддлтон, штат Висконсин, США; № по каталогу QE09050).

Выполняли ПЦР для целевой последовательности B2M и полученную амплифицированную ДНК оценивали по эффективности разрезания с помощью анализа TIDE. Выполняли ПЦР для соответствующих участков с использованием Platinum Taq Supermix (Invitrogen, № по каталогу 125320176 и № по каталогу 11495017). Последовательности праймеров для ПЦР представлены в табл. 2; и условия циклов представлены в табл. 3.

Таблица 2

Праймеры B2M для TIDE			
Название	Тип	Последовательность (5'-3')	SEQ ID NO:
B2MF2	прямой	CAGACAGCAAACCTCACCCAG	4
B2MR2	обратный	AAACTTTGTCCCGACCCTCC	5

Таблица 3

Параметры циклов ПЦР для B2M			
Стадия	Температура	Время	Циклы
Денатурация	94°C	2 мин	1
Денатурация	94°C	15 с	38
Отжиг	55°C	30 с	
Удлинение	68°C	45 с	
Элонгация	68°C	5 мин	1
Удерживание	4	удерживание	

Полученные ампликоны подвергали ПЦР-очистке и секвенированию по Сенгеру. Результаты

секвенирования по Сенгеру вводили в программное обеспечение Tsunami вместе с последовательностью направляющей нуклеиновой кислоты. Проценты инсерционно-делеционных мутаций и идентичности вычисляли с помощью программного обеспечения. Затем отбирали отдельные gRNA на основании их частоты инсерционно-делеционных мутаций в hPSC. На фиг. 1 показана эффективность разрезания при использовании gRNA для B2M-1, B2M-2 и B2M-3.

Нецелевые эффекты выбранных gRNA оценивали в ДНК, полученной из стволовых клеток, с использованием анализа гибридного захвата предсказанных сайтов подобия последовательностей. Нуклеиновые кислоты, направляющие к B2M-2 и B2M-3, не показали выявляемых нецелевых эффектов. gRNA для B2M-2 была выбрана для дальнейших стадий получения клона ввиду ее высокой целевой активности и отсутствия выявляемой нецелевой активности.

Получение клона hPSC B2M KO и определение его характеристик. С использованием gRNA для B2M-2 подвергали электропорации hESC CyT49 (ViaCyte) и сортировали по отдельным клеткам через 3 дня после электропорации с использованием устройства для FACS-сортировки WOLF (Nanocollect) с помещением в 96-луночные планшеты, покрытые BIOLAMININ 521 CTG, с StemFlex и Revitacell. Высевные одиночные клетки выращивали в инкубаторе при нормоксии (37°C, 8% CO<sub>2</sub>) с заменой среды через день до тех пор, пока колонии не становились достаточно большими, чтобы их можно было повторно засеять в виде отдельных клеток. После достижения конfluence образцы разделяли для поддержания и экстракции геномной ДНК.

Состояние B2M KO клонов подтверждали с помощью ПЦР и секвенирования по Сенгеру. Полученные последовательности ДНК целевого участка B2M выравнивали в программном обеспечении Snapgene для определения идентичности инсерционно-делеционных мутаций и зиготности. Клоны с необходимыми редактированиями размножали и дополнительно подтверждали их наличие посредством осуществляемой с помощью проточной цитометрии оценки экспрессии B2M (перечень используемых антител см. в табл. 4). Клоны оценивали с обработкой интерфероном-гамма (25 нг/мл, R & D Systems, 285-IF) и без таковой. На фиг. 2А показана экспрессия B2M в клетках дикого типа, и на фиг. 2В представлена экспрессия B2M в клетках B2M KO. Кариотипический статус клонов оценивали с помощью сервиса Cell Line Genetics (Мадисон, штат Висконсин, США) и регистрировали нормальный кариотип.

Таблица 4

Антитела для проточной цитометрии для определения плюрипотентности

Антиген	Клон	Флуорофор	Изготовитель	№ по каталогу
Oct3/4	40/3	Alexa 647	BD Bioscience	560329
SOX2	030-678	PE	BD Bioscience	562195
B2M	2M2	PE	Biolegend	316305
HLA-ABC	W6/32	Alexa 488	Biolegend	311415
mIgG1 каппа	Нет данных	PE	BD Bioscience	555749
PD-L1	B7-H1	Alexa-488	ThermoFisher	53-5983-42
HLA-E	3D12	PE	ThermoFisher	12-9953-42

Подтверждение того, что клоны сохраняют плюрипотентность, осуществляли с помощью внутриклеточной проточной цитометрии для маркеров плюрипотентности OCT4 и SOX2. Клоны с подтвержденной плюрипотентностью дифференцировали в предшественники эндокринной части поджелудочной железы с использованием ранее созданных способов (Schulz et al. (2012), PLoS ONE, 7(5):e37004).

Пример 3. Создание человеческих плюрипотентных стволовых клеток (hPSC) B2M KO/нокин (KI) PD-L1.

Стратегия разработки B2M KO/PD-L1 KI. Конструкцию плазмиды для вставки PD-L1 (CD274) в локус B2M создавали таким образом, что исходный кодон B2M был удален после подвергания гомологически направленной репарации (HDR) для вставки PD-L1, что сводило на нет любую возможность частичной экспрессии B2M. На фиг. 3 представлена схема плазмиды, и в табл. 5 указаны элементы и их локализация. Плазида-донор содержала управляемую промотором CAGGS cDNA PD-L1, фланкированную плечами гомологии из 800 пар оснований с последовательностью, идентичной локусу B2M вблизи экзона 1. Полная последовательность плазмиды содержит SEQ ID NO: 33.

Таблица 5

Элементы плазмиды-донора B2M-CAGGS-PD-L1

Элемент	Локализация (размер в п. о.)	SEQ ID NO:
Левый ITR	1-130 (130)	6

LHA-B2M	145-944 (800)	7
Энхансер CMV	973-1352 (380)	8
Промотор куриного бета-актина	1355-1630 (276)	9
Химерный интрон	1631-2639 (1009)	10
PD-L1	2684-3556 (873)	11
Сигнал поли(А) bGH	3574-3798 (225)	12
RHA-B2M	3805-4604 (800)	13
Правый ITR	4646-4786 (141)	14
Полная плаزمида	7133 п. о.	33

gRNA для B2M-2 использовали для облегчения вставки трансгена PD-L1 в целевой локус B2M. Плазмиду-донора PD-L1 вводили вместе с комплексом RNP, состоящим из нацеливающейся на B2M gRNA и белка Cas9. На 1 миллион клеток CyT49 (ViaCyte) вместе с RNP доставляли 4 мкг плазмидной ДНК. Электропорацию проводили, как описано в примере 2. Через семь дней после электропорации клетки сортировали в отношении поверхностной экспрессии PD-L1 с использованием устройства для FACS-сортировки WOLF (Nanocollect) с помещением в 96-луночные планшеты, покрытые BIOLAMININ 521 CTG, с StemFlex с Revitacell. Для FACS-сортировки неотредактированные клетки служили отрицательным контролем. PD-L1-положительные клетки отбирали для сортировки и клонирования одиночных клеток.

Для выявления поверхностной экспрессии PD-L1 использовали флуоресцентные антитела к PD-L1 (см. табл. 4). Высеянные одиночные клетки выращивали в инкубаторе при нормоксии (37°C, 8% CO<sub>2</sub>) с заменой среды через день до тех пор, пока колонии не становились достаточно большими, чтобы их можно было повторно засеять в виде отдельных клеток. После достижения конfluence образцы разделяли для поддержания и экстракции геномной ДНК.

Клоны с правильным нацеливанием идентифицировали с помощью ПЦР в отношении вставки путем нокина (KI) PD-L1 с использованием праймеров, которые амплифицируют участок за пределами плеч гомологии плазмиды до вставки cDNA PD-L1, что обеспечивает амплификацию только интегрированной ДНК с KI. Целевую вставку тестировали на зиготность с помощью ПЦР, чтобы оценить, совершается ли KI гетерозиготным или гомозиготным образом. В случае идентификации гетерозиготного клона отрицательный по KI аллель отправляли на секвенирование по Сэнгеру для подтверждения того, что он содержит инсерционно-делеционную мутацию, нарушающую B2M, в аллеле без KI. Клоны с правильным KI с полным нарушением B2M (либо с помощью вставки посредством KI, либо образованием инсерционно-делеционной мутации) размножали в форматах нарастающей культуры тканей до тех пор, пока размер популяции не достигал 30 миллионов клеток. Таким образом размножали примерно 10 клонов и их плюрипотентность подтверждали тестированием в отношении OCT4 и SOX2 с помощью внутриклеточной проточной цитометрии (фиг. 4). Затем клоны, прошедшие указанные выше тесты, дополнительно тестировали с помощью кариотипического анализа (Cell Line Genetics), как описано ниже. Кроме того, затем клоны тестировали по их способности дифференцироваться в предшественники энтодермы поджелудочной железы (ПЕЖ) по установленному протоколу (Schulz et al. (2012), PLoS ONE, 7 (5):e37004), как описано ниже. Потерю B2M далее подтверждали отсутствием экспрессии B2M с обработкой гамма-интерфероном или без нее (25 нг/мл, R & D Systems, 285-IF) с помощью проточной цитометрии. На фиг. 5A и 5B показана экспрессия PD-L1 в клетках дикого типа и клетках B2M KO/PD-L1 KI соответственно.

Пример 4. Кариотипический анализ отредактированных клонов.

Анализ кариотипирования с G-бэндингом отредактированных эмбриональных стволовых (ES) клеток. 1 миллион отредактированных ES-клеток высевали в культуральную колбу T-25 с культуральной средой (DMEM/F12+10% KSR без Xeno с 10 нг/мл активина и 10 нг/мл херегулина). После культивирования в течение ночи три культуральные колбы T-25 отправляли в Cytogenetics Laboratory (Cell Line Genetics, Inc.) для анализа кариотипирования, FISH-анализа на хромосомы 1, 12, 17, 20 и анализа сравнительной геномной гибридизации на чипе (aCGH) со стандартным чипом 8×60K. Результаты G-бэндинга отобранных клеток, подвергнутых электропорации с использованием направляющих нуклеиновых кислот, не обеспечивающих разрезания ("NCG"), клонов B2M KO и клонов B2M KO/PD-L1 KI ("V1-A") показаны в табл. 6.

Таблица 6

Результаты кариотипирования с G-бэндингом

Линия клеток	Тип	Посев	Анализ кариотипирования	FISH-анализ	Анализ aCGH на чипе
NCG №1	Направляющая нуклеиновая кислота, не обеспечивающая	P36	Нормальный	Нормальный	PASS

	разрезания				
NCG №2	Направляющая нуклеиновая кислота, не обеспечивающая разрезания	P36	Нормальный	Нормальный	PASS
B2M KO №1	B2M KO	P38	Нормальный	Нормальный	PASS
B2M KO №2	B2M KO	P36	Нормальный	Нормальный	PASS
B2M KO №3	B2M KO	P36	Нормальный	Нормальный	PASS
V1-A003	B2M KO/PD-L1 KI	P37	Нормальный	Нормальный	PASS
V1-A004	B2M KO/PD-L1 KI	P38	Нормальный	Нормальный	PASS
V1-A007	B2M KO/PD-L1 KI	P37	Нормальный	Нормальный	PASS
V1-A008	B2M KO/PD-L1 KI	P38	Нормальный	Нормальный	PASS

Пример 5. Дифференцировка редактированных человеческих эмбриональных стволовых клеток в энтодермальные клетки поджелудочной железы (PEC).

Поддержание редактированных человеческих эмбриональных стволовых клеток (ES). Редактированные человеческие эмбриональные стволовые клетки при различных посевах (P38-42) высевали при 33000 клеток/см<sup>2</sup> для 4-дневного посева или 50000 клеток/см<sup>2</sup> для 3-дневного посева со средой hESM (DMEM/F12+10% KSR+10 нг/мл активина-A и 10 нг/мл херегулина) и конечной 10% сывороткой АВ человека.

Агрегация редактированных человеческих эмбриональных стволовых клеток для дифференцировки в PEC. Редактированные ES диссоциировали на отдельные клетки с помощью ACCUTASE®, а затем центрифугировали и повторно суспендировали в 2% StemPro (№ по каталогу A1000701, Invitrogen, штат Калифорния, США) в среде DMEM/F12 из расчета 1 миллион клеток на мл и всего 350-400 миллионов клеток высевали в один роллерный флакон емкостью 850 см<sup>2</sup> (№ по каталогу 431198, Корнинг, штат Нью-Йорк, США) со скоростью вращения 8±0,5 об/мин в течение 18-20 ч перед дифференцировкой. Агрегаты ES из редактированных человеческих эмбриональных стволовых клеток дифференцировали в линии клеток поджелудочной железы с использованием роллерных флаконов, как описано в Schulz et al. (2012), PLoS ONE, 7(5):e37004.

Пример 6. Определение характеристик дифференцированных энтодермальных клеток поджелудочной железы (PEC).

Проточная цитометрия в отношении FOXA2 и SOX17 на стадии 1 (DE) и CHGA, PDX1 и NKX6.1 на стадии PEC. Агрегаты, полученные из hESC на стадии 1, или агрегаты клеток поджелудочной железы, полученные из hESC, промывали с помощью PBS, а затем ферментативно диссоциировали до суспензии отдельных клеток при 37°C с использованием ACCUMAX™ (№ по каталогу A7089, Sigma, Миссури, США). Добавляли буфер для разделения MACS (№ по каталогу 130-091-221, Miltenyi Biotec, Северный Рейн-Вестфалия, Германия) и суспензию пропускали через фильтр с размером пор 40 мкм и осаждали. Для окрашивания в отношении внутриклеточного маркера клетки фиксировали в течение 30 мин в 4% (вес/объем) параформальдегиде, промывали в буфере FACS (PBS, 0,1% (вес/объем) BSA, 0,1% (вес/объем) NaN<sub>3</sub>), а затем клетки пермеабелизировали с помощью буфера Perm (PBS, 0,2% (объем/объем) Triton X-100 (№ по каталогу A16046, Alfa Aesar, штат Массачусетс, США), 5% (объем/объем) нормальной сыворотки крои осла, 0,1% (вес/объем) NaN<sub>3</sub>) в течение 30 мин на льду, а затем промывали промывочным буфером (PBS, 1% (вес/объем) BSA, 0,1% (вес/объем) NaN<sub>3</sub>). Клетки инкубировали с первичными антителами (табл. 7), разбавленными блокирующим буфером (PBS, 0,1% (объем/объем) Triton X-100, 5% (объем/объем) нормальной сыворотки крои осла, 0,1% (вес/объем) NaN<sub>3</sub>) в течение ночи при 4°C. Клетки промывали в буфере IC, а затем инкубировали с соответствующими вторичными антителами в течение 60 мин при 4°C. Клетки промывали в буфере IC, а затем в буфере для FACS. Данные проточной цитометрии получали с помощью проточного цитометра NovoCyte (ACEA Biosciences, Брюссель). Данные анализировали с помощью программного обеспечения FlowJo (Tree Star, Inc.). Интактные клетки идентифицировали по прямому (малый угол) и боковому (ортогональный, 90°) светорассеянию. Фон оценивали с использованием контрольных антител и недифференцированных клеток. В графических материалах показан иллюстративный график проточной цитометрии для одной из субпопуляций. Числа, представленные на графических материалах, представляют собой процент от суммарного числа клеток из ворот интактных клеток.

Таблица 7

Антитела для проточной цитометрии для определения характеристик дифференцированных PEC

Антиген	Флуорофор	Источник	Разбавление
SOX17	AF647	BD Bioscience (№ по каталогу 562594)	1:50

FOXA2	PE	Miltenyi Biotechnology (№ по каталогу 130-107-773)	1:10
PDX1	PE	BD Bioscience (№ по каталогу 562161)	1:2,5
NKX6.1	AF647	BD Bioscience (№ по каталогу 563338)	1:2,5
CHGA	AF405	Novus (№ по каталогу NBP2-33198AF405)	1:1000

На стадии DE популяция дважды положительных клеток, положительных по FOXA2 и SOX17, составляла более чем 90% всех клеток из дифференцированных клеток СуТ49 дикого типа. Клетки PD-L1 KI/B2M KO и B2M KO демонстрировали сопоставимый процент DE по сравнению с клетками дикого типа (фиг. 6 и 7).

На стадии PEC проводили проточную цитометрию в отношении хромогранина (CHGA), PDX1 и NKX6.1. Гетерогенная популяция на стадии PEC включает в себя предшественников поджелудочной железы и ранние эндокринные клетки (фиг. 8). По круговой диаграмме гетерогенной популяции (фиг. 9) распределение популяций клеток из дифференцированных редактированных клеток (PD-L1 KI/B2M KO или B2M KO) было в высокой степени подобным таковому для клеток дикого типа.

Нацеленное секвенирование РНК. Нацеленное секвенирование РНК для анализа экспрессии генов выполняли с использованием Illumina TruSeq и настраиваемой панели олигонуклеотидов, нацеливающих на 111 генов. Панель в основном содержала гены, которые являются маркерами стадий развития во время дифференцировки клеток поджелудочной железы. В конце каждой стадии дифференцировки собирали 10 мкл APV (объем агрегированного осадка) и экстрагировали с использованием протокола спин-колонки Qiagen RNeasy или RNeasy 96, включающего в себя обработку ДНКазой на колонке. Количественная оценка и контроль качества выполняли либо с использованием TapeStation в сочетании с Qubit, либо с использованием Qiagen QIAxcel. 50-200 нг РНК обрабатывали в соответствии с протоколом подготовки библиотеки Illumina TruSeq, который состоит из синтеза cDNA, гибридизации пула специально созданных олигонуклеотидов, отмывки, удлинения, лигирования связанных олигонуклеотидов, ПЦР-амплификации библиотек и очистки библиотек перед количественной оценкой и контролем качества полученных библиотек dsDNA либо с использованием TapeStation в сочетании с Qubit, либо с использованием Qiagen QIAxcel. Затем библиотеки разбавляли до концентрации 4 нМ и объединяли с последующей денатурацией, добавлением контроля PhiX и дальнейшим разбавлением до 10-12 пМ перед загрузкой в секвенатор Illumina MiSeq. После цикла секвенирования выполняли начальный анализ данных автоматически с помощью BaseSpace, генерирующего необработанные подсчеты чтений для каждого из специально созданных зондов. Для каждого гена эти подсчеты чтений затем суммировали для всех зондов, соответствующих этому гену, с добавлением 1 подсчета чтений (для предотвращения последующих делений на 0). Нормализацию выполняли по гену SF3B2 и считывания обычно визуализировали как кратное изменение по сравнению со стадией 0. Когда данные обрабатывали для анализа главных компонентов, нормализацию выполняли с использованием способа DEseq.

Экспрессия выбранных генов показана на фиг. 10. Кинетический паттерн экспрессии FOXA2, CHGA, PDX1 и NKX6.1 в клетках PD-L1 KI/B2M KO или B2M KO являлся подобным таковому в клетках дикого типа.

Подтверждение экспрессии B2M и PD-L1 на стадии PEC. На стадии PEC дифференцированные агрегаты обрабатывали с помощью гамма-интерферона (50 нг/мл) или без него в течение 48 ч. Агрегаты промывали PBS, а затем ферментативно диссоциировали до суспензии отдельных клеток при 37°C с использованием ACCUMAX™ (№ по каталогу A7089, Sigma, штат Миссури, США). Добавляли буфер для разделения MACS (№ по каталогу 130-091-221, Miltenyi Biotec, Северный Рейн-Вестфалия, Германия) и суспензию пропускали через фильтр с размером пор 40 мкм и осаждали. Для окрашивания в отношении поверхностного маркера диссоциированные клетки инкубировали с флуоресцентно-контрагентным антителом, разбавленным буфером для разделения MACS, в течение 20 мин, а затем промывали в буфере для разделения MACS. Клетки повторно суспендировали в буфере для FACS для обеспечения текучести. Данные проточной цитометрии получали с помощью проточного цитометра NovoCyte. Как показано на фиг. 11A-11F, экспрессия B2M была ниже предела выявления в PEC, дифференцированных из B2M KO (фиг. 11B) или PD-L1 KI/B2M KO (фиг. 11C), а PD-L1 экспрессировался в PEC, дифференцированных из клеток PD-L1 KI/B2M KO (фиг. 11F). В целом более чем приблизительно 90% PEC экспрессировали PD-L1, что указывает на гомогенность популяции клеток. Часто происходит потеря экспрессии трансгена с течением времени после дифференцировки стволовых клеток с отредактированными генами (Hong et al., Mol. Ther., 2017, 25(1):44-53).

Иммунный фенотип клеток PEC. На стадии PEC дифференцированные агрегаты обрабатывали с помощью гамма-интерферона (50 нг/мл) или без него в течение 48 ч. Агрегаты собирали для окрашивания в отношении МНС класса I и II. Экспрессия МНС класса II отсутствовала на стадии PEC в клетках дикого типа или редактированных клетках (PD-L1 KI/B2M KO и B2M KO) (фиг. 12D-12F). Экспрессия HLA-ABC (МНС класса I) была низкой (1,3% клеток дикого типа) и в высокой степени регулировалась при стимуляции IFN-γ. Однако HLA-ABC не экспрессировался редактированными

клетками (PD-L1 KI/B2M KO и B2M KO) даже при стимуляции с помощью IFN- $\gamma$  (фиг. 12A-12C).

Пример 7. Получение человеческих плюрипотентных стволовых клеток (hPSC) TXNIP KO.

Отбор направляющей РНК (gRNA) для TXNIP. Для нацеливания на экзон 1 и экзон 2 кодирующей последовательности TXNIP были разработаны десять gRNA, нацеленных на TXNIP (табл. 8). Последовательности РАМ выделены жирным шрифтом в целевых последовательностях, представленных в табл. 8, и последовательности ДНК, соответствующие направляющим последовательностям, представлены в табл. 8. Эти gRNA характеризовались низкими прогнозируемыми показателями отклонения от цели на основе предсказания гомологии последовательностей с использованием программного обеспечения для разработки gRNA.

Таблица 8

Отобранные целевые последовательности в TXNIP и последовательности gRNA

Название	Целевая последовательность (5'-3') (последовательность РАМ выделена жирным шрифтом)	SEQ ID NO:	ДНК-версия направляющей последовательности (5'-3')	SEQ ID NO:
TXNIP_Exon 1_T1	GAAGCGTGTCTTCATA GCGCAGG	45	GAAGCGTGTCTTCATAG CGC	15
TXNIP_Exon 1_T21	TTACTCGTGTCAAAGC CGTTAGG	46	TTACTCGTGTCAAAGCC GTT	16
TXNIP_Exon 1_T22	TGTCAAAGCCGTTAGG ATCCTGG	47	TGTCAAAGCCGTTAGGA TCC	17
TXNIP_Exon 1_T23	GCCGTTAGGATCCTGG CTTGCGG	48	GCCGTTAGGATCCTGGC TTG	18
TXNIP_Exon 1_T25	GCGGAGTGGCTAAAG TGCTTTGG	49	GCGGAGTGGCTAAAGTG CTT	19
TXNIP_Exon 1_T5	TCCGCAAGCCAGGATC CTAACGG	50	TCCGCAAGCCAGGATCC TAA	20
TXNIP_Exon 2_T4	GTTCGGCTTTGAGCTT CCTCAGG	51	GTTCGGCTTTGAGCTTCC TC	21
TXNIP_Exon 2_T2	GAGATGGTGATCATG AGACCTGG	52	GAGATGGTGATCATGAG ACC	22
TXNIP_Exon 2_T1	TTGTAATCATATTTGT TTCCAGG	53	TTGTAATCATATTTGTTT CC	23
TXNIP_Exon 2_T3	AACAAATATGAGTAC AAGTTCCGG	54	AACAAATATGAGTACAA GTT	24

Получение клона TXNIP KO hiPSC и определение его характеристик. Для осуществления оценки эффективности разрезания этих gRNA в hiPSC, клетки TC1133 hiPSC подвергали электропорации с применением системы для электропорации Neon (Neon Transfection System ThermoFisher, № по каталогу MPK5000) со смесью рибонуклеопротеина (RNP) белка Cas9 (Biomay) и направляющей РНК (Synthego) при молярном соотношении 3:1 (gRNA:Cas9) с абсолютными значениями 125 пмоль Cas9 и 375 пмоль gRNA. Для образования комплекса RNP gRNA и Cas9 объединяли в одном сосуде с R-буфером до общего объема 25 мкл и инкубировали в течение 15 мин при к. т. Клетки диссоциировали с использованием ACCUTASE®, затем повторно суспендировали в среде DMEM/F12 (Gibco, № по каталогу 11320033), подсчитывали с использованием NC-200 (Chemometec) и центрифугировали. Всего  $1 \times 10^6$  клеток повторно суспендировали с комплексом RNP и добавляли R-буфер до суммарного объема 125 мкл. Затем эту смесь использовали для электропорации с применением параметров: 2 импульса, 30 мс, 1100 В. После электропорации клетки переносили пипеткой в пробирку Eppendorf, заполненную средой StemFlex с RevitaCell. Затем эту клеточную суспензию высевали в чашки для культур тканей, предварительно покрытые BIOLAMININ 521 CTG. Клетки культивировали в инкубаторе при нормоксии (37°C, 8% CO<sub>2</sub>) в течение 48 ч. Через 48 ч геномную ДНК собирали из клеток с использованием QuickExtract.

Выполняли ПЦР для целевой последовательности TXNIP и полученную в результате амплифицированную ДНК секвенировали по Сэнгеру. Анализ TIDE применяли для анализа данных, полученных в результате секвенирования, в отношении процентов инсерционно-делеционных мутаций с применением программного обеспечения Tsunami. На фиг. 13 показана эффективность разрезания для gRNA для TXNIP. Далее gRNA отбирали на основе обеспечиваемой ими частоты инсерционно-делеционных мутаций в hPSC.

Нецелевые эффекты gRNA с наиболее высокой эффективностью разрезания оценивали в ДНК, полученной из стволовых клеток, с использованием анализа гибридного захвата предсказанных сайтов подобия последовательностей. Дальнейшие эксперименты проводили с использованием gRNA для

TXNIP T5, поскольку для нее не было показано выявляемых нецелевых эффектов и было продемонстрировано высокую целевую активность.

Получение клона hPSC TXNIP KO и определение его характеристик. СуТ49 hESC (Viacyte) подвергли электропорации с использованием gRNA для TXNIP T5 и сортировке по отдельным клеткам через 3 дня после электропорации с использованием устройства для FACS-сортировки WOLF (Nanocollect) с помещением в 96-луночные планшеты с BIOLAMININ 521 CTG с StemFlex и Revitacell. Высейные одиночные клетки выращивали в инкубаторе при нормоксии (37°C, 8% CO<sub>2</sub>) с заменой среды через день до тех пор, пока колонии не становились достаточно большими, чтобы их можно было повторно засеять в виде отдельных клеток. После достижения конfluence образцы разделяли для поддержания и экстракции геномной ДНК.

Наличие у клонов состояния TXNIP KO подтверждали с помощью ПЦР и секвенирования по Сэнгеру. Полученные в результате последовательности ДНК целевого участка TXNIP выравнивали с программным обеспечением Snaregene для определения идентичности инсерционно-делеционных мутаций и зиготности. Клоны с необходимыми редактированиями размножали и дополнительно подтверждали их наличие посредством осуществляемой с помощью проточной цитометрии оценки экспрессии TXNIP. Карипотипический статус клонов оценивали с помощью сервиса Cell Line Genetics и регистрировали нормальный карипотип (табл. 9).

Таблица 9

## Анализ карипотипа

Линия клеток	Посев	Анализ карипотипирования	FISH-анализ	Анализ aCGH на чипе
TXNIPKO № 2	P31	Нормальный	Нормальный	PASS
TXNIPKO № 13	P31	Нормальный	Нормальный	PASS

Подтверждение того, что клоны сохраняют плюрипотентность, осуществляли с помощью внутриклеточной проточной цитометрии для маркеров плюрипотентности OCT4 и SOX2. Клоны с подтвержденной плюрипотентностью дифференцировали в предшественники эндокринной части поджелудочной железы с использованием ранее созданных способов (Schulz et al. (2012), PLoS ONE, 7(5):e37004).

Нацеленное секвенирование РНК для анализа экспрессии генов выполняли с использованием Illumina TruSeq и настраиваемой панели олигонуклеотидов, как описано выше. Экспрессия выбранных генов показана на фиг. 20. Кинетический паттерн экспрессии FOXA2, CHGA, PDX1 и NKX6.1 в клетках TXNIP KO являлся подобным таковому в клетках дикого типа. На стадии PEC также была выполнена проточная цитометрия по хромогранину (CHGA), PDX1 и NKX6.1. Гетерогенная популяция на стадии PEC включала 30,6% клеток-предшественников поджелудочной железы (т.е. CHGA<sup>+</sup>/NKX6.1<sup>+</sup>/PDX1<sup>+</sup>) (фиг. 21).

Пример 8. Получение человеческих плюрипотентных стволовых клеток (hPSC) B2M KO/PD-L1 KI и TXNIP KO/HLA-E KI.

Стратегия разработки B2M KO/PD-L1 KI и TXNIP KO/HLA-E KI. Были получены клетки, в которых кодирующая последовательность PD-L1 была вставлена в локус B2M (обеспечивая таким образом нокаут гена B2M) и кодирующая последовательность HLA-E была вставлена в локус TXNIP (обеспечивая таким образом нокаут гена TXNIP).

Конструкция плазмиды для вставки PD-L1 (CD274) в локус B2M была описана в примере 3. Плазида-донор содержит cDNA PD-L1, управляемую промотором CAGGS, фланкированную плечами гомологии из 800 пар оснований с последовательностью, идентичной локусу B2M вблизи экзона 1. gRNA для B2M-2 использовали для облегчения вставки трансгена PD-L1 в целевой локус B2M. Плазмиду-донора PD-L1 вводили вместе с комплексом RNP, состоящим из нацеливающейся на B2M gRNA и белка Cas9. На 1 миллион клеток СуТ49 (ViaCyte) вместе с RNP доставляли 4 мкг плазмидной ДНК. Электропорацию проводили, как описано в примере 2. Через семь дней после электропорации осуществляли обогащение клеток в отношении PD-L1-положительных клеток посредством сортировки клеток на основе магнитного взаимодействия (MACS) с использованием реагентов Miltenyi (Anti-Mouse IgG MicroBeads, № по каталогу 130-048-401, колонки для жидкостной хроматографии, № по каталогу 130-042-401, и сепаратор MidiMACS, № по каталогу 130-042-302) или реагенты ThermoFisher (магнитный штатив DynaMag™-15, № по каталогу 12301D, набор CELLection™ Pan Mouse IgG CELLection™, № по каталогу 11531D, Dynabeads™ Pan Mouse IgG, № по каталогу 11042).

После размножения обогащенной в отношении PD-L1-положительных клеток популяции трансген с cDNA тримера HLA-E вставляли в геномный локус TXNIP посредством CRISPR-индуцируемой HDR с использованием плазмиды-донора, содержащей последовательность HLA-E. cDNA тримера HLA-E состояла из сигнального пептида B2M, слитого с пептидом презентации HLA-G, слитым с мембранным белком B2M, слитым с белком HLA-E без его сигнального пептида. Эта тримерная конструкция была опубликована ранее (Gornalusse et al. (2017), Nat. Biotechnol., 35(8):765-772). Кодирующая последовательность тримера HLA-E (включая линкеры) представляет собой SEQ ID NO: 55 (т.е. SEQ ID NO: 26-31). Плазида-донор для доставки HLA-E содержит промотор CAGGS, управляющий экспрессией тримера HLA-E,

фланкированного плечами гомологии из 800 пар оснований с последовательностью, идентичной локусу TXNIP вблизи экзона 1 (фиг. 14, табл. 10 и 11). В некоторых вариантах осуществления плазмиды-донор содержит SEQ ID NO: 34 или 56.

Таблица 10

## Элементы плазмиды-донора TXNIP-CAGGS-HLA-E 1

Элемент	Локализация (размер в п. о.)	SEQ ID NO:
Левый ITR	1-130 (130)	6
LHA-TXNIP	145-944 (800)	25
Энхансер CMV	973-1352 (380)	8
Промотор куриного бета-актина	1355-1630 (276)	9
Химерный интрон	1631-2639 (1009)	10
Сигнальная последовательность B2M	2684-2743 (60)	26
Пептид HLA-G	2744-2770 (27)	27
Линкер GS	2771-2815 (45)	28
Мембранный белок B2M	2816-3112 (297)	29
Линкер GS	3113-3172 (60)	30
HLA-E	3173-4183 (1011)	31
Сигнал поли(A) bGH	4204-4428 (225)	12
RHA-TXNIP	4435-5234 (800)	32
Правый ITR	5276-5416 (141)	14
Полная плаزمида	7763 п. о.	34

Таблица 11

## Элементы плазмиды-донора TXNIP-CAGGS-HLA-E 2

Элемент	Локализация (размер в п. о.)	SEQ ID NO:
Левый ITR	1-130 (130)	6
LHA-TXNIP	145-944 (800)	25
Энхансер CMV	973-1352 (380)	8
Промотор куриного бета-актина	1355-1630 (276)	9
Химерный интрон (усеченный)	1631-2336 (706)	57
Сигнальная последовательность B2M	2381-2440 (60)	26
Пептид HLA-G	2441-2467 (27)	27
Линкер GS	2468-2512 (45)	28
Мембранный белок B2M	2513-2809 (297)	29
Линкер GS	2810-2869 (60)	30
HLA-E	2870-3880 (1011)	31
Сигнал поли(A) bGH	3901-4125 (225)	12
RHA-TXNIP	4132-4931 (800)	32
Правый ITR	4973-5113 (141)	14
Полная плазмида	7460 п. о.	56

Для облегчения вставки трансгена HLA-E в целевом локусе TXNIP использовали gRNA для TXNIP T5. Плазмиду-донор с HLA-E вводили вместе с комплексом RNP, состоящим из gRNA для TXNIP T5 и белка Cas9. На 1 млн. PD-L1+ клеток 4 мкг ДНК плазмиды-донора HLA-E (SEQ ID NO: 56) было доставлено вместе с RNP. Альтернативно может применяться ДНК плазмиды-донора HLA-E (SEQ ID NO: 34). Электропорацию проводили, как описано в примере 2. Через семь дней после электропорации осуществляли обогащение клеток в отношении HLA-E-положительных клеток посредством MACS с использованием реагентов Miltenyi или реагентов ThermoFisher. После обогащения в отношении HLA-E клетки сортировали по отдельным клеткам с использованием устройства для FACS-сортировки WOLF (Nanocollect) с помещением в 96-луночные планшеты, покрытые BIOLAMININ 521 CTG, с StemFlex и Revitacell. Высеванные одиночные клетки выращивали в инкубаторе при нормоксии (37°C, 8% CO<sub>2</sub>) с заменой среды через день до тех пор, пока колонии не становились достаточно большими, чтобы их можно было повторно засеять в виде отдельных клеток. После достижения конfluence образцы разделяли для поддержания и экстракции геномной ДНК. Антитела к PD-L1 и к HLA-E (табл. 4) использовали для обогащения с помощью MACS и FACS-сортировки с помещением в 96-луночные планшеты с использованием гейтирования, настроенного на дважды положительные клетки, положительные по HLA-E и PD-L1. Для FACS-сортировки нередактированные клетки служили отрицательным контролем.

Клоны с правильным нацеливанием идентифицировали с помощью ПЦР в отношении осуществленной посредством KI вставки PD-L1 и осуществленной посредством KI вставки HLA-E с использованием праймеров, которые обеспечивают амплификацию участка, находящегося в плазмиде вне

плеч гомологии, прилегающих к вставке cDNA PD-L1 или вставке cDNA HLA-E соответственно, обеспечивая таким образом амплификацию только ДНК, встроенной посредством KI. Целевую вставку тестировали на зиготность с помощью ПЦР, чтобы оценить, совершается ли KI гетерозиготным или гомозиготным образом. В случае идентификации гетерозиготного клона отрицательный по KI аллель отправляли на секвенирование по Сэнгеру для подтверждения того, что он содержит инсерционно-делеционную мутацию, нарушающую B2M, или инсерционно-делеционную мутацию, нарушающую TXNIP, соответственно. Клоны с правильным KI с полным нарушением B2M и TXNIP (либо с помощью вставки посредством KI, либо образования инсерционно-делеционной мутации) размножали в форматах нарастающей культуры тканей до тех пор, пока размер популяции не достигал 30 миллионов клеток. Таким образом обеспечили размножение примерно 10 клонов и их плюрипотентность подтвердили тестированием в отношении OCT4 и SOX2 с помощью внутриклеточной проточной цитометрии (фиг. 15).

Затем клоны, прошедшие указанные выше тесты, дополнительно тестировали с помощью кариотипического анализа (Cell Line Genetics), как описано выше. Результаты G-бэндинга отобранных клонов B2M KO/PD-L1 KI+TXNIP KO/HLA-E KI ("V1-B") показаны в табл. 12. Дополнительно, клоны V1-B затем тестировали в отношении их способности дифференцироваться предшественников энтодермальной части поджелудочной железы (PEC).

Таблица 12

## Результаты G-бэндинга

Линия клеток	Посев	Анализ кариотипирования	FISH-анализ	Анализ aCGH на чипе
V1-B003	P37	Нормальный	Нормальный	PASS
V1-B007	P37	Нормальный	Нормальный	PASS
V1-B008	P36	Нормальный	Нормальный	PASS

PD-L1 и HLA-E продолжали экспрессироваться после дифференцировки до клеток стадии 6 в соответствии с ранее опубликованным протоколом для эндокринной части поджелудочной железы (Rezania et al. (2014), Nat. Biotechnol., 32(11):1121-1133) (фиг. 16). Популяция дифференцированных клеток является гомогенной в отношении экспрессии трансгена, например, 94,4% клеток экспрессируют PD-L1, и 97,0% клеток экспрессируют HLA-E. На фиг. 22A показана подобная морфология клеток разных клонов ("S6-V1B-H9", "S6-V1B-3B11", "S6-V1B-1G7" и "S6-V1B-3C2"), дифференцированных до стадии 6, по сравнению с таковой у клеток дикого типа и контрольных клеток с направляющей нуклеиновой кислотой, не обеспечивающей разрезания. Экспрессия выбранных генов в клонах B2M KO/PD-L1 KI и TXNIP KO/HLA-E KI показана на фиг. 23A-23F. Кинетический паттерн экспрессии INS, NKX6.1, GCK, GCG и SST в клетках клонов B2M KO/PD-L1 KI и TXNIP KO/HLA-E KI являлся подобным таковому в клетках дикого типа (фиг. 23A). Уровни экспрессии маркеров стадии 6, INS (фиг. 23B), NKX6.1 (фиг. 23C), GCG (фиг. 23D), SST (фиг. 23E) и GCK (фиг. 23F), в разных дифференцированных клонах B2M KO/PD-L1 KI и TXNIP KO/HLA-E KI ("S6-V1B-H9", "S6-V1B-3B11", "S6-V1B-1G7" и "S6-V1B-3C2") являлись подобными уровням на стадии 6 в клетках дикого типа и островковых клетках дикого типа. Недифференцированный клон B2M KO/PD-L1 KI и TXNIP KO/HLA-E KI ("ES-V1B-H9") использовали в качестве отрицательного контроля.

На фиг. 24A, 24B показаны результаты осуществленной с помощью проточной цитометрии оценки экспрессии INS и GCG (фиг. 24A) и экспрессии INS и NKX6.1 (фиг. 24B) в клетках на стадии 6, дифференцированных из клона B2M KO/PD-L1 KI и TXNIP KO/HLA-E KI. На фиг. 25A, 25B показано процентное значение экспрессии INS (фиг. 25A) и экспрессии NKX6.1 (фиг. 25B) в клетках на стадии 6, дифференцированных из двух клонов B2M KO/PD-L1 KI и TXNIP KO/HLA-E KI ("S6-V1B003" и "V1B-H9"). Экспрессия в обоих случаях являлась подобной таковой у клеток дикого типа и контрольных клеток с направляющей нуклеиновой кислотой, не обеспечивающей разрезания.

На стадии PEC была выполнена проточная цитометрия по хромогранину (CHGA), PDX1 и NKX6.1. Гетерогенная популяция на стадии PEC включает в себя предшественников клеток поджелудочной железы, ранние эндокринные клетки (фиг. 17). Нацеленное секвенирование РНК для анализа экспрессии генов выполняли, как описано выше. Экспрессия выбранных генов для клона TXNIP KO показана на фиг. 18A, и экспрессия выбранных генов для клона V1-B показана на фиг. 18B. Кинетический паттерн экспрессии FOXA2, CHGA, PDX1 и NKX6.1 в клетках клонов V1-B или TXNIP KO являлся подобным таковому в клетках дикого типа.

Были получены клетки, в которых последовательность, кодирующая HLA-E, была вставлена в локус TXNIP (с обеспечением таким образом нокаута гена TXNIP) с использованием вектора-донора HLA-E, содержащего нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 56. Нацеленное секвенирование РНК для анализа экспрессии генов выполняли, как описано выше. Экспрессия выбранных генов для клона TXNIP KO/HLA-E KI показана на фиг. 28. Кинетический паттерн экспрессии FOXA2, CHGA, PDX1 и NKX6.1 в клетках TXNIP KO/HLA-E KI являлся подобным таковому в клетках дикого типа.

Альтернативно были получены клетки, в которых последовательность, кодирующая HLA-E, была вставлена в локус TXNIP с использованием вектора-донора HLA-E, содержащего нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 34. Все редактированные клетки были подвергнуты дифференцировке

до стадии PEC, и экспрессия HLA-E происходила в по меньшей мере 75% популяции клеток (данные не показаны). При оценке с помощью проточной цитометрии, экспрессия PDX1 и NKX6.1 в клетках PEC, дифференцированных из клеток TXNIP KO, являлась подобной таковой в клетках PEC, дифференцированных из клеток дикого типа (данные не показаны).

Пример 9. Анализ активации/пролиферации Т-клеток.

Дифференцированные из PEC клетки тестировали на их способность запускать иммунный ответ с помощью *in vitro* анализов активации/пролиферации человеческих Т-клеток. Свежие PBMC доноров приобретали в компании Nemasare и CD3<sup>+</sup> Т-клетки очищали с использованием набора для выделения всех Т-клеток для человека (Miltenyi, № по каталогу 130-096-535). Выделенные Т-клетки метили с помощью протокола набора для пролиферации клеток CellTrace™ CFSE (ThermoFisher, № по каталогу C34554) в соответствии с инструкциями производителя и инкубировали совместно с дифференцированной PEC в течение 5 дней. Использовали Dynabeads™ Human T-Activator CD3/CD28 для размножения и активации Т-клеток (ThermoFisher, № по каталогу 11161D) в качестве положительного контроля для активации Т-клеток. Т-клетки отдельно метили с помощью CFSE и использовали в качестве отрицательного контроля. Для оценки процента пролиферации Т-клеток измеряли процент CD3<sup>+</sup> CFSE<sup>+</sup> клеток (фиг. 19А, 19В). PEC WT запускали пролиферацию Т-клеток, превышающую таковую в контроле в виде Т-клеток отдельно. PEC, полученные из B2M KO, B2M KO/PD-L1 KI и B2M KO/PD-L1 KI+TXNIP KO/HLA-E KI СуТ49, не запускали пролиферацию Т-клеток на уровне, который бы превышал таковой в контроле в виде Т-клеток отдельно, что свидетельствует о гипоиimmunогенной природе редактированных клеток.

Пример 10. Исследование *in vivo* эффективности клональных линий с нацеливанием генов.

Энтодермальные клетки поджелудочной железы получали из клональных линий клеток hES, полученных из СуТ49, с помощью следующих генетических модификаций: 1) целевая делеция экспрессии B2M и принудительная экспрессия PD-L1; 2) целевая делеция экспрессии B2M и принудительная экспрессия HLA-E; или 3) целевая делеция TXNIP. В дополнение была получена клональная линия немодифицированных клеток в результате трансфекции с помощью направляющей РНК, не обеспечивающей разрезания (NCG).

В соответствии со стандартной процедурой агрегаты энтодермальных клеток поджелудочной железы, полученные из указанных клональных линий, загружали в перфорированные устройства (PD) для получения тестовых или контрольных препаратов. PD позволяют осуществлять непосредственную васкуляризацию при подкожной трансплантации, и инкапсулированные клетки-предшественники поджелудочной железы созревают *in vivo* в функциональные эндокринные клетки поджелудочной железы, в том числе чувствительные к глюкозе, инсулинпродуцирующие клетки.

Как обобщено в табл. 13, пяти группам бестимусных крыс провели подкожную имплантацию двух препаратов, каждый из которых содержал примерно  $7 \times 10^6$  энтодермальных клеток поджелудочной железы, полученных в результате дифференцировки четырех клональных линий, описанных выше, или клеток дикого типа СуТ49 hES (ViaCyte).

Таблица 13

Схема исследования

Номер группы	ID группы	Происхождение hESC	Генетическая модификация		Количество животных	Конечная точка
			Нокаут (потеря функции)	Нокин (приобретенные функции)		
1	Контроль	Немодифицированные СуТ49	Отсутствует	Отсутствует	6 на группу	20 недель
2	NCG	Подклон СуТ49	Отсутствует	Отсутствует		
3	TXNIP KO	Подклон СуТ49	TXNIP	Отсутствует		
4	B2M KO/PD-L1	Подклон СуТ49	B2M	PD-L1		
5	B2M KO/HLA-E	Подклон СуТ49	B2M	HLA-E		

Начиная с 12 недель всех выживших животных подвергали оценке эффективности с помощью тестирования на стимулированную глюкозой секрецию инсулина (GSIS). Образцы крови получали от животных не натощак перед внутрибрюшинным введением 3 г/кг глюкозы и после него. Значения концентрации С-пептида человека в сыворотке крови определяли с помощью стандартных твердофазных иммуноферментных анализов.

Тестирование в отношении GSIS выполняли в недели 12, 16 и 20. Результаты указывают на отсутствие существенных отличий между экспериментальными группами, особенно после момента

времени 12 недель. По сравнению с уровнями С-пептида, обнаруженными в контрольной группе (группа 1, от <40 пМ до 2,0 нМ, среднее значение 1,1 нМ), уровни С-пептида являлись повышенными у 2 из 6 животных из группы 3 (TXNIP KO, среднее значение 1,5 нМ). Другие группы, группа 2 (NCG, среднее значение 0,5 нМ), группа 4 (B2M KO/PD-L1 KI, среднее значение 0,5 нМ) и группа 5 (B2M KO/HLA-E KI, среднее значение 0,4 нМ), демонстрировали диапазон уровней С-пептида, подобный таковому у контрольной группы, однако при этом у большего числа животных значения находились вблизи нижнего предела диапазона. Однако, эти отличия не являлись статистически значимыми. Эти результаты указывают на то, что ни генетические модификации, которые были введены, ни манипуляции, необходимые для получения клональных линий, не влияли на способность рассматриваемых линий клеток дифференцироваться в энтодермальные клетки поджелудочной железы *in vitro* и впоследствии обеспечивать получение функциональных бета-клеток *in vivo*.

Через 20 недель, после тестирования в отношении GSIS, животных умерщвляли и эксплантированные тестовые препараты фиксировали в нейтральном забуференном формалине, переносили на предметные стекла и окрашивали с помощью гематоксилина и эозина и с помощью иммуногистохимического окрашивания на инсулин и глюкагон.

В оценках эффективности *in vivo*, осуществленных путем тестирования в отношении GSIS, было показано отсутствие существенных отличий между неотредактированными контрольными препаратами и отредактированными тестовыми препаратами, составленными с использованием энтодермальных клеток поджелудочной железы, полученных из клональных линий клеток, каждая из которых несла подмножество генетических модификаций. Результаты позволяют предположить, что индивидуальные генетические модификации и процесс, с помощью которого их вводят, могут переноситься *in vivo*.

Пример 11. Исследование *in vivo* эффективности линий клеток B2M KO/PD-L1 KI, TXNIP KO/HLA-E KI.

Четыре клональные линии получали по сути как описано выше в примере 8 и загружали в перфорированные устройства для получения тестовых препаратов. Контрольные препараты содержали немодифицированные клетки СуТ49 (ViaCyte). Препараты, содержащие приблизительно  $7 \times 10^6$  энтодермальных клеток поджелудочной железы, имплантировали под кожу бестимусным крысам (2 препарата/крыса, 8 крыс/группа).

В недели 12, 16, 20 и 24 всех выживших животных подвергали тестированию на стимулированную глюкозой секрецию инсулина (GSIS). Образцы крови получали от животных натощак перед внутрибрюшинным введением 3 г/кг глюкозы и после него. Значения концентрации С-пептида человека в сыворотке крови определяли с помощью стандартных твердофазных иммуноферментных анализов. С-пептид в сыворотке крови был обнаружен у большинства животных через 12 недель после имплантации. Уровни С-пептида в сыворотке крови в недели 16, 20, и 24 после имплантации представлены в табл. 14. Между группами животных, которым имплантировали клетки с отредактированными генами, и таковыми, которым имплантировали контрольные клетки, не наблюдали статистически значимых отличий.

Таблица 14

Уровни С-пептида в сыворотке крови *in vivo*.

Группы	С-пептид в сыворотке крови (пмоль)		
	Среднее значение	Нижний 95%	Верхний 95%
Клетки с отредактированными генами - 16 недель	729	40	1418
Клетки с отредактированными генами - 20 недель	1080	391	1769
Клетки с отредактированными генами - 24 недели	1676	987	2365
Контрольные клетки - 16 недель	1075	386	1764
Контрольные клетки - 20 недель	1883	1193	2572
Контрольные клетки - 24 недели	2466	1777	3155

Через 25 недель выжившие животные будут подвергнуты нагрузке инсулином (тест на толерантность к инсулину, ИТТ) для оценки изменения содержания С-пептида человека в сыворотке крови в ответ на снижение содержания глюкозы в крови при отсутствии доступа к пище. Образцы крови будут получены от животных натощак до внутрибрюшинного введения 1 единицы инсулина на кг веса тела и в несколько моментов времени (15, 30, 60 мин) после него. Значения концентрации С-пептида человека в сыворотке крови будут определять с помощью стандартных твердофазных иммуноферментных анализов.

Через 26 недель выжившие животные будут умерщвлены и эксплантированные тестовые препараты будут переноситься на предметные стекла и окрашены с помощью гематоксилина и эозина и с помощью иммуногистохимического окрашивания (ИНС) на инсулин и глюкагон для выявления эндокринных клеток поджелудочной железы человека. Будут выполнены дополнительные ИНС-анализы на

специфический для человека ядерный маркер NuMA1 для выявления потенциального местоположения клеток, происходящих из трансплантата, вне полости эксплантата тестового препарата.

Пример 12. Исследование эффективности линий клеток B2M KO/PD-L1 KI, TXNIP KO/HLA-E KI *in vivo*.

Агрегаты энтодермальных клеток поджелудочной железы B2M KO/PD-L1 KI, TXNIP KO/HLA-E KI (содержащие примерно  $7 \times 10^6$  клеток) будут составлены в тестовые препараты. Каждой из сорока шести бестимусных крыс будет проведена подкожная имплантация двух тестовых препаратов. Животных в исследовании будут оценивать на GSIS, ИТТ и содержание глюкозы в крови натощак (NFBG). Десять животных на группу будут умерщвлять в запланированные моменты времени завершения участия в исследовании в недели 13, 17, 26 и 39, при этом в исследование будут включены 6 дополнительных животных для компенсации возможных случаев преждевременного незапланированного завершения участия в исследовании. По два эксплантированных тестовых препарата от каждого из животных будут случайным образом назначать для использования либо в гистологической оценке, либо оценке общего содержания С-пептида. В табл. 15 представлена схема исследования.

Таблица 15

Схема исследования

Номер группы	Количество тестовых препаратов	Количество животных	Моменты времени GSIS (недели)	Моменты времени ИТТ (недели)	Конечная ИТТ точка (недели)	Анализы эксплантата
1	20	10 самцов	12	н. д.	13	Для каждой группы: Гистология 5 животных Содержание С-пептида 5 животных
2	20	10 самцов	12, 16	н. д.	17	
3	20	10 самцов	12, 16, 20, 24	25	26	
4	Не более 32	Не более 16 самцов	12, 16, 20, 24, 30, 36	25, 33	39	
Всего	92	46 самцов				

В недели 12, 16, 20, 24, 30 и 36 все выжившие животные будут подвергнуты оценке эффективности с помощью тестирования на стимулированную глюкозой секрецию инсулина (GSIS). Образцы крови будут получать от животных натощак перед внутрибрюшинным введением 3 г/кг глюкозы и после него. Значения концентрации С-пептида человека в сыворотке крови будут определять с помощью стандартных твердофазных иммуноферментных анализов.

В недели 25 и 33 выжившие животные будут подвергнуты нагрузке инсулином (тест на толерантность к инсулину, ИТТ) для оценки изменения нагрузки С-пептидом человека в сыворотке крови в ответ на снижение содержания глюкозы в крови при отсутствии доступа к пище. Образцы крови будут получены от животных натощак до внутрибрюшинного введения 1 единицы инсулина на кг веса тела и в несколько моментов времени (15, 30, 60 мин) после него. Значения концентрации С-пептида человека в сыворотке крови будут определять с помощью стандартных твердофазных иммуноферментных анализов.

Содержание глюкозы в крови натощак (NFBG) будет измеряться до начала прекращения питания для тестирования на GSIS и ИТТ примерно в недели 12, 16, 20, 24, 25, 30, 33 и 36.

В запланированных конечных точках, указанных в табл. 13, животные будут умерщвлены. Умерщвление будет выполняться путем обеспечения вдыхания CO<sub>2</sub> с последующей билатеральной торакотомией. Макроскопическое вскрытие будет выполняться во всех случаях запланированного и незапланированного прекращения участия в исследовании и будут регистрироваться макроскопические патологические изменения.

Определенные эксплантаты будут замораживаться с последующей гомогенизацией содержимого полости. Общее содержание С-пептида в гомогенате будут определять с помощью стандартных твердофазных иммуноферментных анализов. Общее содержание С-пептида в эксплантате будет использоваться для прогнозирования клинической дозировки.

Определенные эксплантированные тестовые препараты будут фиксироваться в нейтральном забуференном формалине, переноситься на предметные стекла и окрашиваться с помощью гематоксилина и эозина и с помощью иммуногистохимического окрашивания (ИНС) на инсулин и глюкагон для выявления эндокринных клеток поджелудочной железы человека. Будут выполнены дополнительные ИНС-анализы на специфический для человека ядерный маркер NuMA1 для выявления

потенциального местоположения клеток, происходящих из трансплантата, вне полости эксплантата тестового препарата.

Пример 13. Получение B2M KO/PD-L1 KI, TXNIP KO/HLA-E KI в iPSC человека.

Получали iPSC человека (iPSC 0025), в которых последовательность, кодирующая PD-L1, была вставлена в локус B2M. Комплекс RNP получали путем объединения gRNA для B2M-2 (SEQ ID NO: 2) и белка Cas9 при молярном соотношении 3:1 (gRNA:Cas9). Для образования комплекса RNP gRNA и Cas9 объединяли в одном сосуде с R-буфером до общего объема 25 мкл и инкубировали в течение 15 мин при к. т. Клетки диссоциировали с использованием ACCUTASE®, затем повторно суспендировали в среде DMEM/F12 (Gibco, № по каталогу 11320033), подсчитывали с использованием NC-200 (Chemometec) и центрифугировали. Всего с комплексом RNP ресуспендировали  $1 \times 10^6$  клеток. Четыре мкг плазмиды-донора B2M-CAGGS-PD-L1 (SEQ ID NO: 33) и R-буфера добавляли до общего объема 125 мкл. Затем эту смесь использовали для электропорации с применением параметров: 2 импульса, 30 мс, 1100 В. Через семь дней после электропорации осуществляли обогащение клеток в отношении PD-L1-положительных клеток посредством MACS с использованием реагентов Miltenyi или реагентов ThermoFisher, по сути как описано выше в примере 8.

После размножения обогащенной в отношении PD-L1-положительных клеток популяции клетки подвергали электропорации с использованием комплекса RNP, содержащего gRNA для TXNIP T5 (SEQ ID NO: 20) и белок Cas9 при молярном соотношении 3:1 (gRNA:Cas9), и 4 мкг плазмиды-донора 2 TXNIP-CAGGS-HLA-E (SEQ ID NO: 56), по сути как описано выше. Через семь дней после электропорации осуществляли обогащение клеток в отношении HLA-E-положительных клеток посредством MACS с использованием реагентов Miltenyi или реагентов ThermoFisher. После обогащения в отношении HLA-E клетки сортировали по отдельным клеткам с использованием устройства для FACS-сортировки WOLF (Nanocollect) с помещением в 96-луночные планшеты, покрытые BIOLAMININ 521 CTG, с StemFlex и Revitacell. Высейнные одиночные клетки выращивали в инкубаторе при нормоксии (37°C, 8% CO<sub>2</sub>) с заменой среды через день до тех пор, пока колонии не стали достаточно большими, чтобы их можно было повторно засеять как отдельные клетки. После достижения конfluence образцы разделяли для поддержания и экстракции геномной ДНК. Антитела к PD-L1 и к HLA-E (табл. 4) использовали для обогащения с помощью MACS и FACS-сортировки с помещением в 96-луночные планшеты с использованием гейтирования, настроенного на дважды положительные клетки, положительные по HLA-E и PD-L1. Для FACS-сортировки неотредактированные клетки служили отрицательным контролем.

Клоны с правильным нацеливанием идентифицировали с помощью ПЦР в отношении осуществленной посредством KI вставки PD-L1 и осуществленной посредством KI вставки HLA-E с использованием праймеров, которые обеспечивают амплификацию участка, находящегося в плазмиде вне плеч гомологии, прилегающих к вставке cDNA PD-L1 или вставке cDNA HLA-E соответственно, обеспечивая таким образом амплификацию только ДНК, встроенной посредством KI. Целевую вставку тестировали на пригодность с помощью ПЦР, чтобы оценить, совершается ли KI гетерозиготным или гомозиготным образом. В случае идентификации гетерозиготного клона отрицательный по KI аллель отправляли на секвенирование по Сэнгеру для подтверждения того, что он содержит инсерционно-делеционную мутацию, нарушающую B2M, или инсерционно-делеционную мутацию, нарушающую TXNIP, соответственно. Клоны с правильным KI с полным нарушением B2M и TXNIP (либо с помощью вставки посредством KI, либо образования инсерционно-делеционной мутации) размножали в форматах нарастающей культуры тканей до тех пор, пока размер популяции не достигал 30 миллионов клеток. Обеспечивали размножение выбранных клонов и их плюрипотентность подтверждали тестированием в отношении OCT4 и SOX2 с помощью внутриклеточной проточной цитометрии.

Дифференцировка четырех отредактированных клонов hiPSC (VI-B) была осуществлена с использованием протокола для эндокринной части поджелудочной железы из работы Reznia et al. (Nat Biotechnol., 2014 Nov, 32(11):1121-33). На стадии 4 осуществляли проточную цитометрию в отношении хромогранина (CHGA), PDX1 и NKX6.1. Результаты определения PDX1 и NKX6.1 для клона (клона 1) высейнного при разных репрезентативных значениях плотности, показаны на фиг. 26А. Все четыре клон являлись отрицательными по CHGA. Также была осуществлена проточная цитометрия в отношении PD-L1 и HLA-E. Результаты определения PD-L1 и HLA-E для клона (клона 1) показаны на фиг. 26В.

Пример 14. Способ изготовления банков замороженных клеток человеческих плюрипотентных стволовых клеток (hPSC) B2M KO/PD-L1 KI, TXNIP KO/HLA-E KI.

CyT49 hESC (ViaCyte) подвергали электропорации с использованием комплекса RNP, содержащего gRNA для B2M-2 (SEQ ID NO: 2) и белок Cas9 при молярном соотношении 3:1 (gRNA:Cas9), и 4 мкг плазмиды-донора B2M-CAGGS-PD-L1 (SEQ ID NO: 33) в течение 2 импульсов по 30 мс при 1100 В. После электропорации, клетки переносили пипеткой в пробирку Eppendorf, заполненную средой StemFlex с RevitaCell. Эту клеточную суспензию затем высевали в чашки для культуры тканей, предварительно покрытые BIOLAMININ 521 CTG при разбавлении 1:20. Клетки культивировали в инкубаторе при нормоксии (37°C, 8% CO<sub>2</sub>).

Через семь дней после электропорации осуществляли обогащение клеток в отношении PD-L1-положительных клеток посредством MACS с использованием антител к PD-L1, меченых Alexa-488, и

магнитных гранул (DYNABEADS® Pan Mouse IgG; Thermo Fisher). Размножение PD-L1-положительных клеток обеспечивали путем культивирования в среде для размножения XF-KSR (Gibco) в течение 7 дней.

PD-L1-положительные клетки затем подвергали электропорации с использованием комплекса RNP, содержащего gRNA для TXNIP T5 (SEQ ID NO: 20) и белок Cas9 при молярном соотношении 3:1 (gRNA:Cas9), и 4 мкг плазмиды-донора 2 TXNIP-CAGGS-HLA-E (SEQ ID NO: 56) в течение 2 импульсов по 30 мс при 1100 В. После электропорации, клетки переносили пипеткой в пробирку Eppendorf, заполненную средой StemFlex с RevitaCell. Эту клеточную суспензию затем высевали в чашки для культуры тканей, предварительно покрытые BIOLAMININ 521 CTG при разбавлении 1:20. Клетки культивировали в инкубаторе при нормоксии (37°C, 8% CO<sub>2</sub>).

Через семь дней после электропорации осуществляли обогащение клеток в отношении HLA-E-положительных клеток посредством MACS с использованием антител к HLA-E, меченых PE, и магнитных гранул (DYNABEADS® Pan Mouse IgG; Thermo Fisher). Размножение дважды положительных клеток, положительных по PD-L1 и HLA-E, осуществляли путем культивирования в среде для размножения XF-KSR (Gibco) в течение приблизительно 5 дней.

Дважды положительные клетки, положительные по PD-L1 и HLA-E, были подвергнуты сортировке по одной клетке. Для этого клетки подпитывали с использованием StemFlex Complete с Revitacell (до конечной концентрации 1× Revitacell) за 3-4 ч до диссоциации с помощью ACCUTASE®. После диссоциации отдельные клетки отсортировывали с помещением в отдельные лунки 96-луночного планшета для культуры ткани, покрытого BIOLAMININ. Устройство для FACS-сортировки WOLF (Nanocollect) применяли для сортировки отдельных клеток с помещением в лунки с использованием антител к PD-L1 и к HLA-E, описанных выше. Планшеты предварительно заполняли 100-200 мкл StemFlex Complete с Revitacell. Через три дня после посева клеток в клетки подпитывали свежей StemFlex и продолжали подпитывать через день 100-200 мкл среды. После 10 дней роста клетки ежедневно подпитывали StemFlex до дня 12-14. В этот момент времени в планшетах осуществляли диссоциацию с помощью ACCUTASE® и собранные клеточные суспензии разделяли 1:2 с помещением в два 96-луночные планшета, которые культивировали в течение приблизительно 4 дней.

Одну часть клеток собирали для визуального анализа (морфологии) и анализа ДНК (ПЦР и секвенирование ДНК для анализа на зиготность и профиль инсерционно-делеционных мутаций) и остальные клетки культивировали и обеспечивали их размножение для культивирования в колбах T175. После приблизительно двух недель культивирования клоны отбирали для замораживания. До и после замораживания клетки характеризовали в отношении морфологии, жизнеспособности, эндотоксинов, микоплазмы, кариотипа, плюрипотентности, способности к дифференцировке, анализа целевого/нецелевого воздействия, случайного встраивания плазмиды, остаточного содержания Cas9/плазмиды с использованием стандартных процедур. Клетки замораживали в среде для криохранения и хранили во флаконах для криохранения при -80°C или в жидком азоте.

Отдельный клон B2M KO/PD-L1 KI+TXNIP KO/HLA-E KI ("посевной клон") был изготовлен и выделен с использованием указанного способа. Обеспечивали дифференцировку посевного клона до стадии PEC определяли его характеристики. На фиг. 27A показано, что морфология посевного клона на стадии PEC являлась подобной таковой в клетках дикого типа. На фиг. 27B показано, что кинетический паттерн экспрессии FOXA2, CHGA, PDX1 и NKX6.1 в течение времени дифференцировки клеток в клетках, дифференцированных из посевного клона, являлся подобным таковому в клетках дикого типа. На фиг. 27C показано процентное значение CHGA<sup>-</sup>/NKX6.1<sup>+</sup>/PDX1<sup>+</sup> клеток в дифференцированной популяции.

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ получения генетически модифицированной клетки, где способ включает доставку в клетку (a) первой CRISPR-нуклеазы и первой направляющей РНК (gRNA), нацеленных на сайт-мишень в пределах гена, который кодирует тиоредоксин-взаимодействующий белок (TXNIP), или рядом с ним, где первая gRNA содержит спейсерную последовательность, соответствующую последовательности, состоящей из любой из SEQ ID NO: 15-24; и

(b) первой нуклеиновой кислоты, содержащей нуклеотидную последовательность, кодирующую антиген гистосовместимости HLA класса I, альфа-цепь E (HLA-E), которая фланкирована (i) нуклеотидной последовательностью, гомологичной участку, расположенному слева от целевого сайта из (a), и (ii) нуклеотидной последовательностью, гомологичной участку, расположенному справа от целевого сайта из (a),

где первая сайт-направленная нуклеаза расщепляет целевой сайт из (a) и первая нуклеиновая кислота из (b) вставляется в сайт, который частично перекрывает сайт из (a), полностью перекрывает его или содержится в нем, с обеспечением таким образом получения генетически модифицированной клетки, где генетически модифицированная клетка характеризуется повышенной выживаемостью клеток по сравнению с клеткой, в которую не была вставлена данная нуклеиновая кислота из (b).

2. Способ по п.1, где нуклеотидная последовательность, кодирующая HLA-E, содержит последовательность, кодирующую тример HLA-E, содержащий сигнальный пептид B2M, слитый с пептидом пре-

зентации HLA-G, слитым с мембранным белком B2M, слитым с HLA-E без его сигнального пептида.

3. Способ по п.2, где последовательность, кодирующая тример HLA-E содержит SEQ ID NO: 55.

4. Способ по любому из пп.1-3, где нуклеотидная последовательность из (b) (i) содержит SEQ ID NO: 25 и нуклеотидная последовательность из (b) (ii) содержит SEQ ID NO: 32.

5. Способ по любому из пп.1-4, где способ дополнительно включает доставку в клетку

(c) второй CRISPR-нуклеазы и второй направляющей РНК (gRNA), нацеленных на сайт в пределах гена, который кодирует бета-2-микроглобулин (B2M); и

(d) второй нуклеиновой кислоты, содержащей нуклеотидную последовательность, кодирующую лиганд запрограммированной гибели 1 (PD-L1), которая фланкирована (iii) нуклеотидной последовательностью, гомологичной участку, расположенному слева от целевого сайта из (c), и (iv) нуклеотидной последовательностью, гомологичной участку, расположенному справа от целевого сайта из (c),

при этом вторая CRISPR-нуклеаза расщепляет целевой сайт из (c) и вторая нуклеиновая кислота из (d) вставляется в сайт, который частично перекрывает сайт из (c), полностью перекрывает его или содержится в нем, при этом генетически модифицированная клетка характеризуется повышенной способностью к ускользанию от иммунного надзора и/или выживаемостью клеток по сравнению с клеткой, в которую не была вставлена вторая нуклеиновая кислота из (d).

6. Способ по п.5, где вторая gRNA содержит спейсерную последовательность, соответствующую последовательности, состоящей из любой из SEQ ID NO: 1-3 и 35-44.

7. Способ по п.5 или 6, где нуклеотидная последовательность из (d) (iii) содержит SEQ ID NO: 7 и нуклеотидная последовательность из (d) (iv) содержит SEQ ID NO: 13.

8. Способ по любому из пп.1-7, где

первая CRISPR-нуклеаза представляет собой нуклеазу Cas9 типа II или нуклеазу Cfp1 типа V и первая CRISPR-нуклеаза связана с по меньшей мере одним сигналом ядерной локализации; и/или

вторая CRISPR-нуклеаза представляет собой нуклеазу Cas9 типа II или нуклеазу Cfp1 типа V и вторая CRISPR-нуклеаза связана с по меньшей мере одним сигналом ядерной локализации.

9. Способ по любому из пп.1-8, где первая CRISPR-нуклеаза и первая gRNA присутствуют при молярном соотношении 1:3 и/или вторая CRISPR-нуклеаза и вторая gRNA присутствуют при молярном соотношении 1:3.

10. Способ по любому из пп.1-9, где нуклеотидная последовательность, кодирующая HLA-E, функционально связана с экзогенным промотором и/или нуклеотидная последовательность, кодирующая PD-L1, функционально связана с экзогенным промотором.

11. Способ по п.10, где экзогенный промотор является конститутивным, индуцируемым, времяспецифическим, тканеспецифическим или клеточноспецифическим промотором.

12. Способ по п.10, где экзогенный промотор представляет собой промотор CMV, EF1 $\alpha$ , PGK, CAG или UBC.

13. Способ по любому из пп.1-12, где клетка представляет собой клетку млекопитающего.

14. Способ по любому из пп.1-13, где клетка представляет собой клетку человека.

15. Способ по любому из пп.1-14, где клетка представляет собой плюрипотентную стволовую клетку, эмбриональную стволовую клетку, стволовую клетку взрослого организма, индуцированную плюрипотентную стволовую клетку или гемопоэтическую стволовую клетку.

16. Способ по любому из пп.1-14, где клетка представляет собой дифференцированную клетку или соматическую клетку и/или генетически модифицированная клетка способна дифференцироваться в линииспецифические клетки-предшественники или полностью дифференцированные соматические клетки.

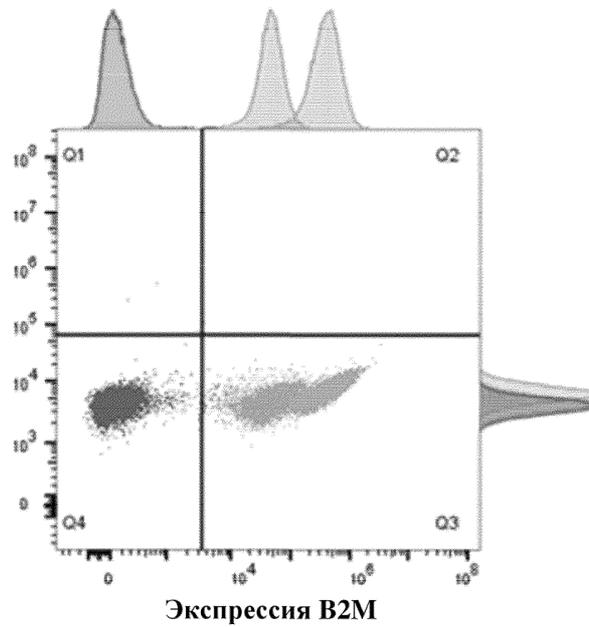
17. Способ по п.16, где линииспецифические клетки-предшественники представляют собой предшественники энтодермальной части поджелудочной железы, предшественники эндокринной части поджелудочной железы, мезенхимальные клетки-предшественники, мышечные клетки-предшественники, бластные клетки, гемопоэтические клетки-предшественники или нервные клетки-предшественники и/или полностью дифференцированные соматические клетки представляют собой бета-клетки поджелудочной железы, эпителиальные клетки, энтодермальные клетки, макрофаги, гепатоциты, адипоциты, клетки почки, клетки крови, кардиомиоциты или клетки иммунной системы.

Эффективность разрезания gRNA с помощью B2M в CyT49



Фиг. 1

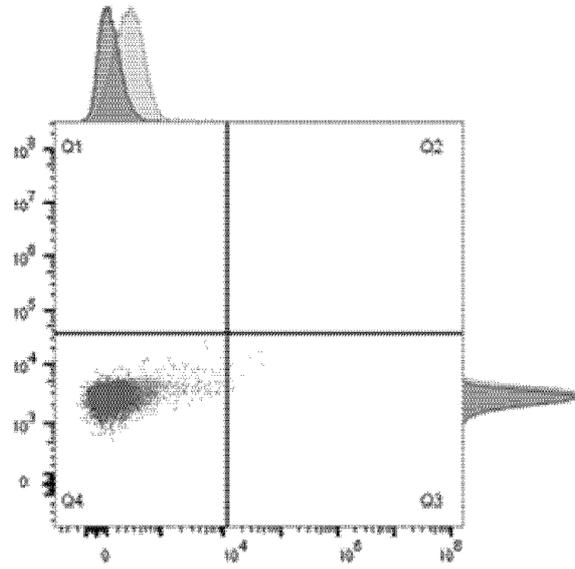
СУТ49 WT ВЮ-1



□	Обозначения рабочей зоны
■	Контроль IgG
■	50 нг INTG-1
■	NT-1

Фиг. 2А

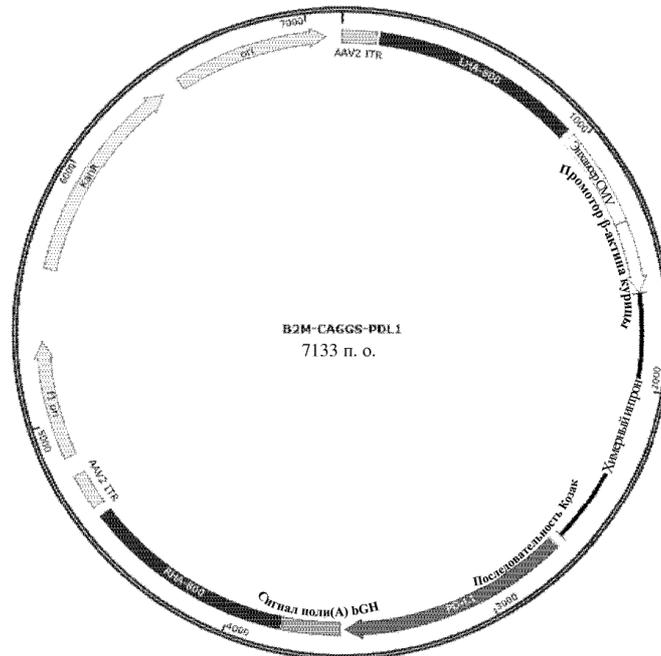
B2M-KO-1 BIO-1



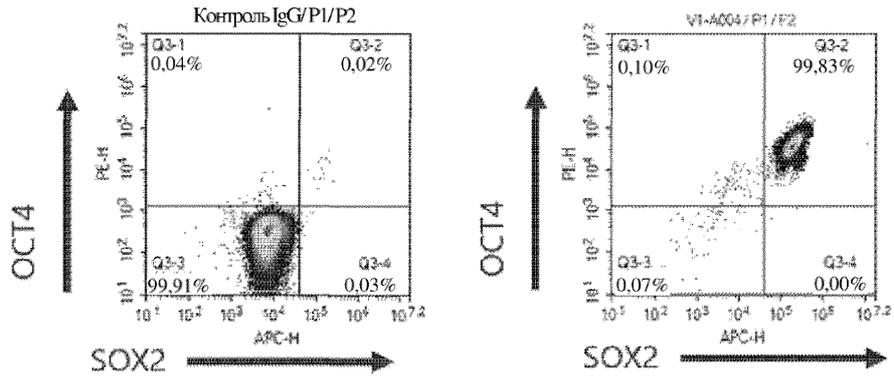
Экспрессия B2M

Область рабочей зоны
Контроль IgG
50 нг INTG-1
NT-1

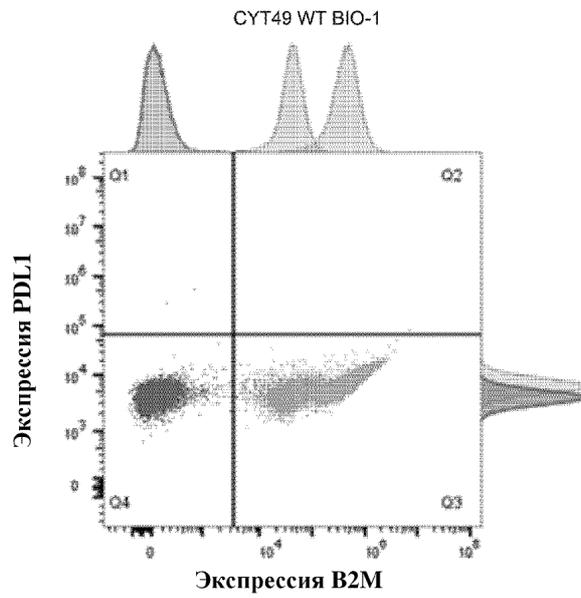
Фиг. 2В



Фиг. 3

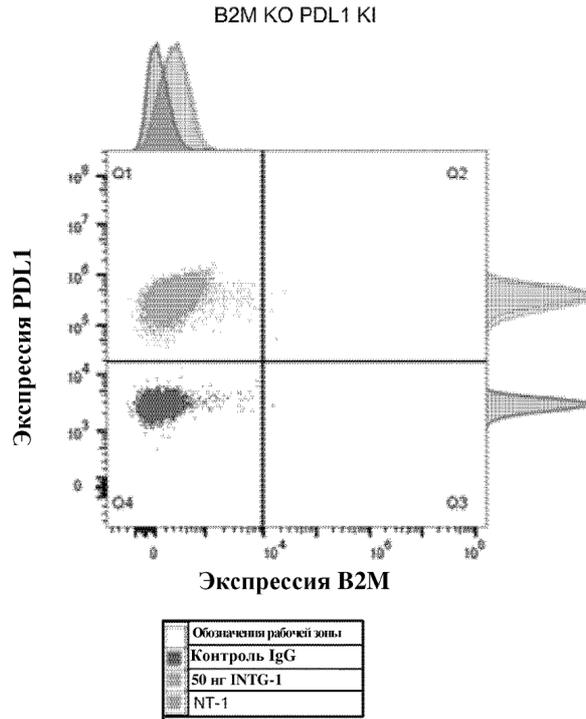


Фиг. 4

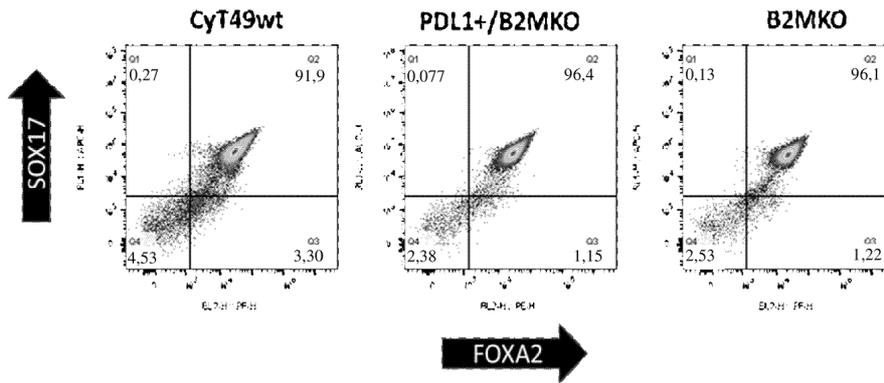


Область рабочей зоны
Контроль IgG
50 нг INTG-1
NT-1

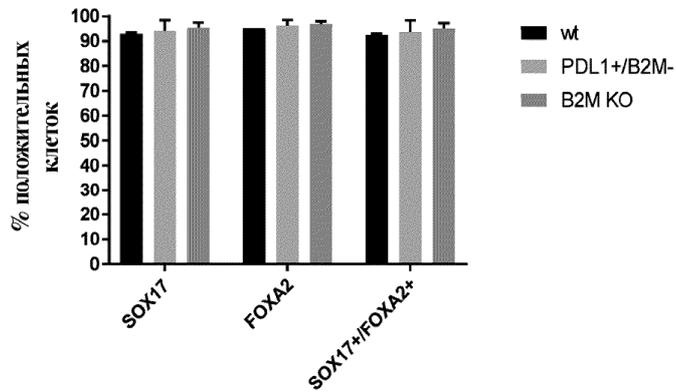
Фиг. 5А



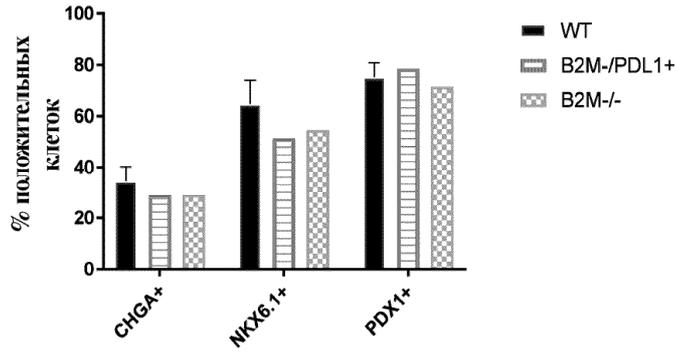
Фиг. 5B



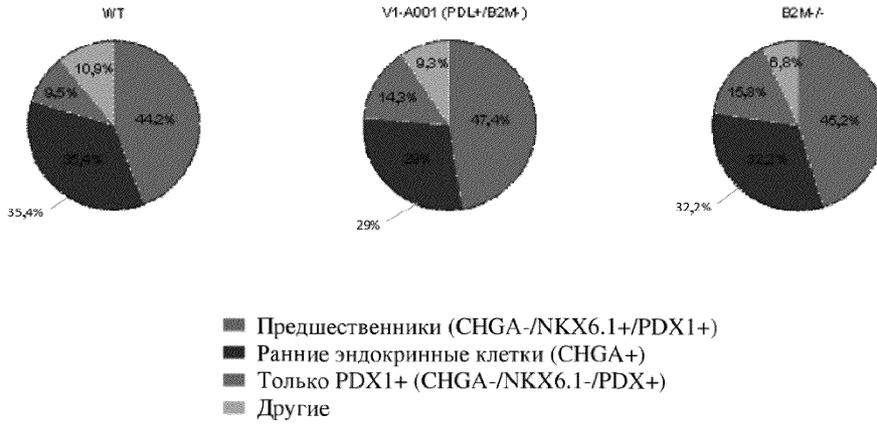
Фиг. 6



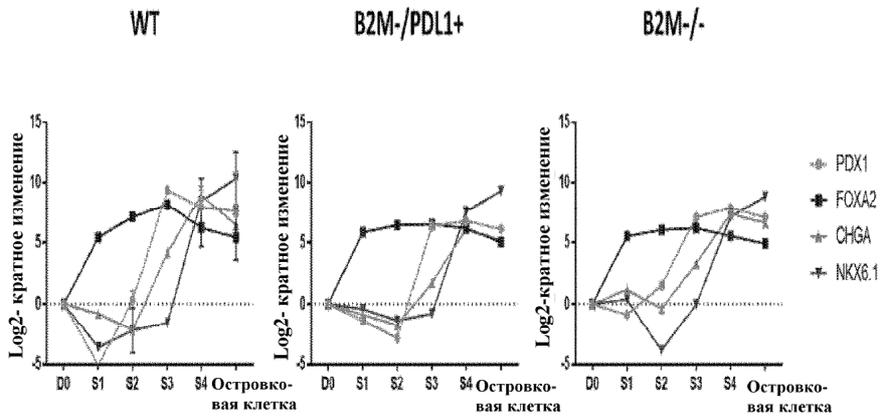
Фиг. 7



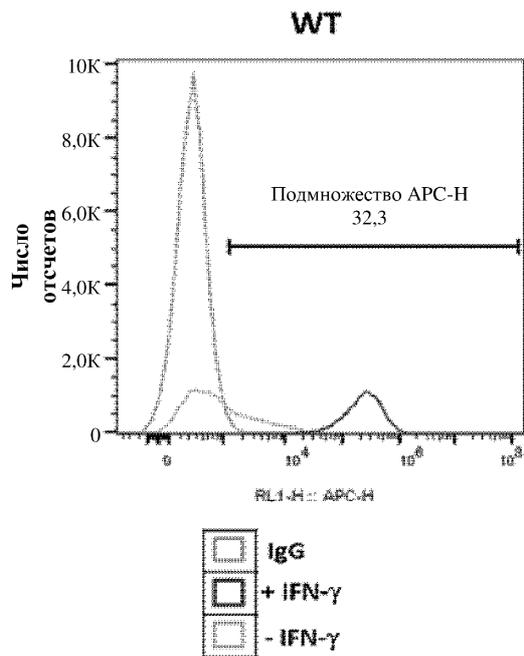
Фиг. 8



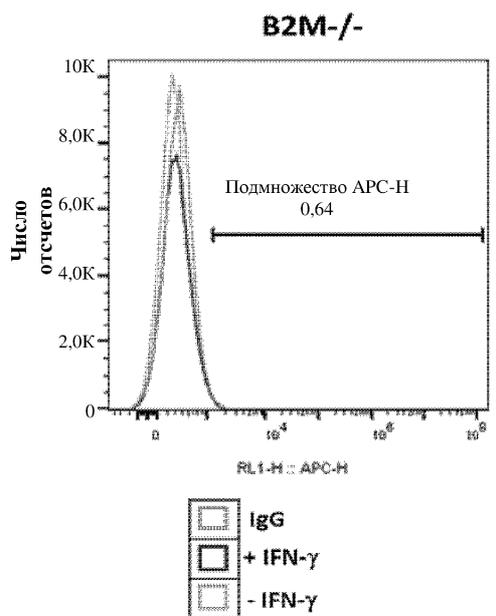
Фиг. 9



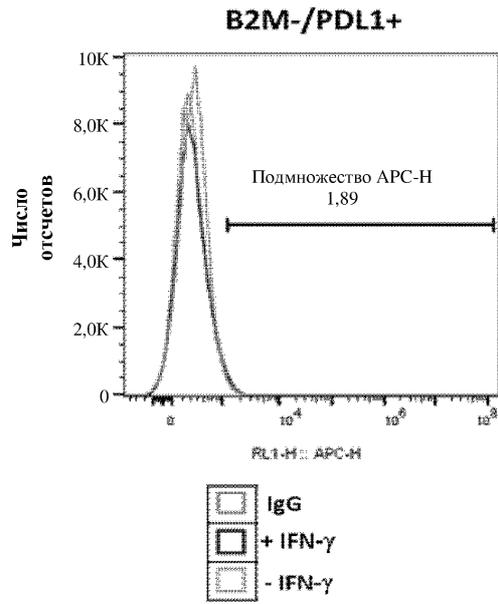
Фиг. 10



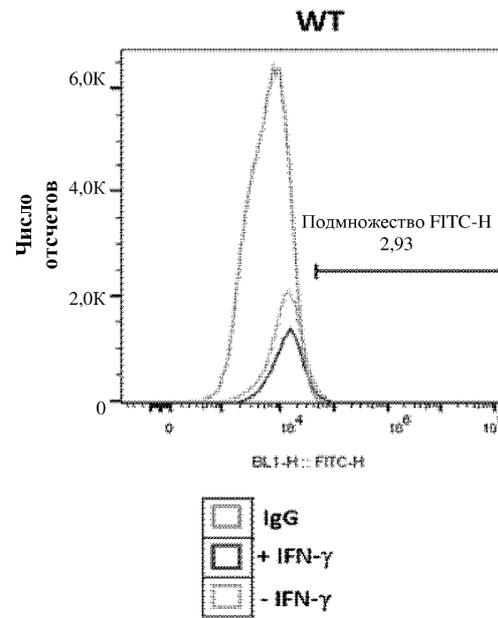
Фиг. 11А



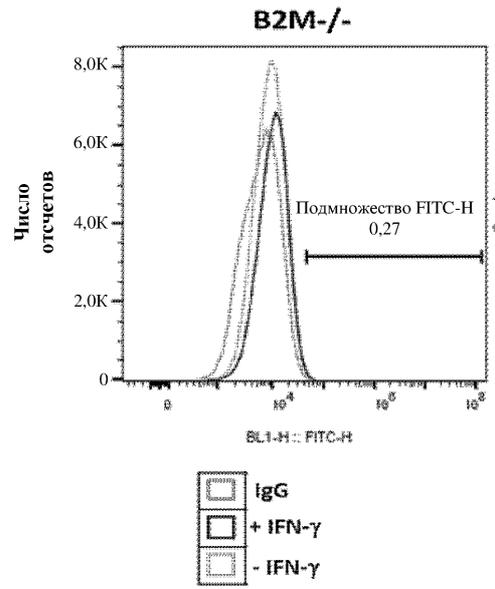
Фиг. 11В



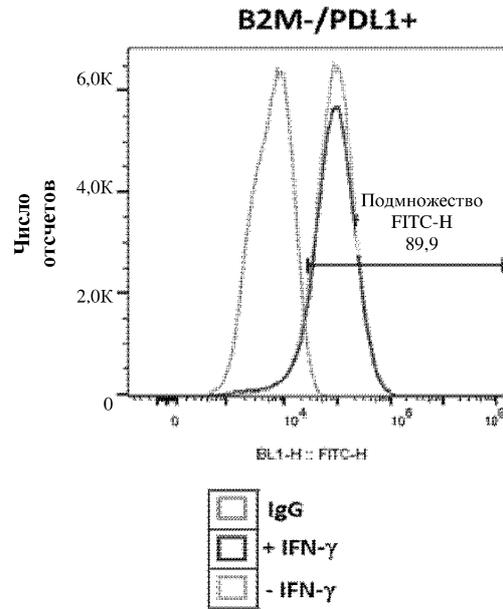
Фиг. 11C



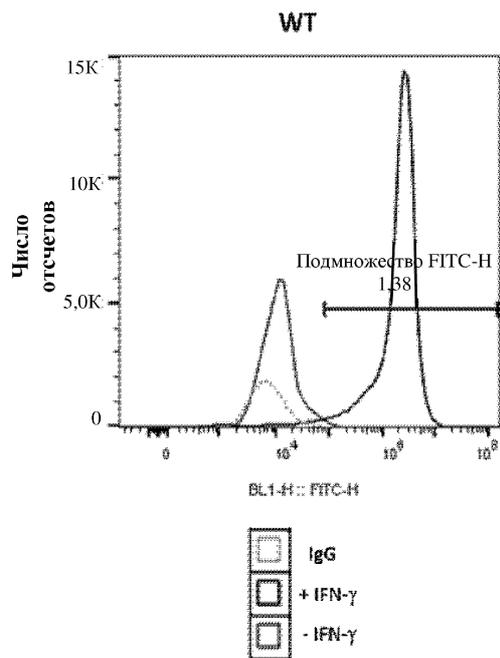
Фиг. 11D



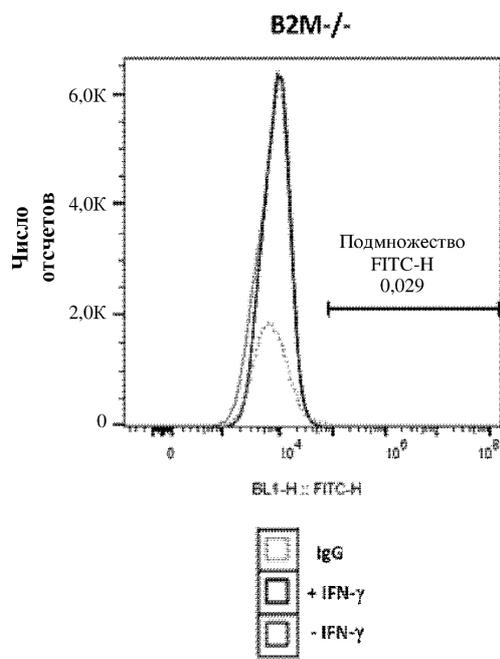
Фиг. 11E



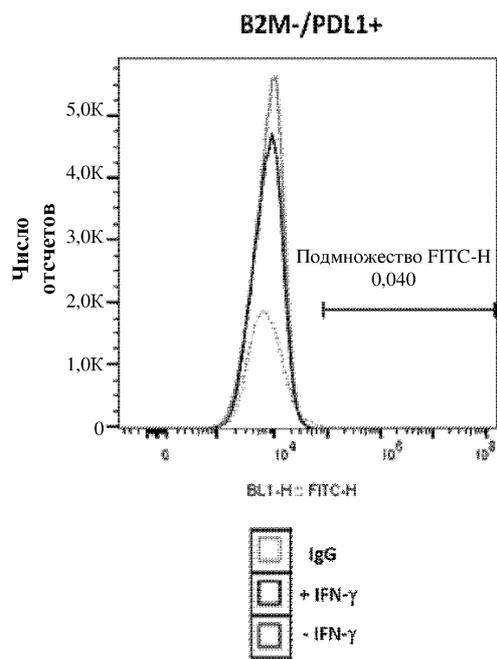
Фиг. 11F



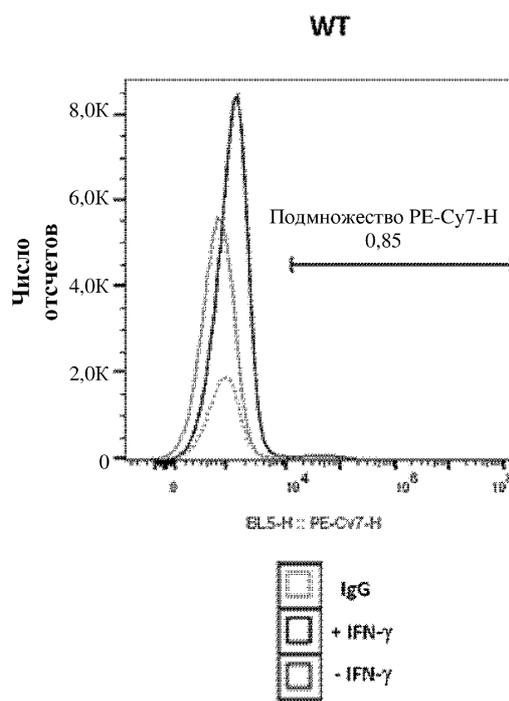
Фиг. 12А



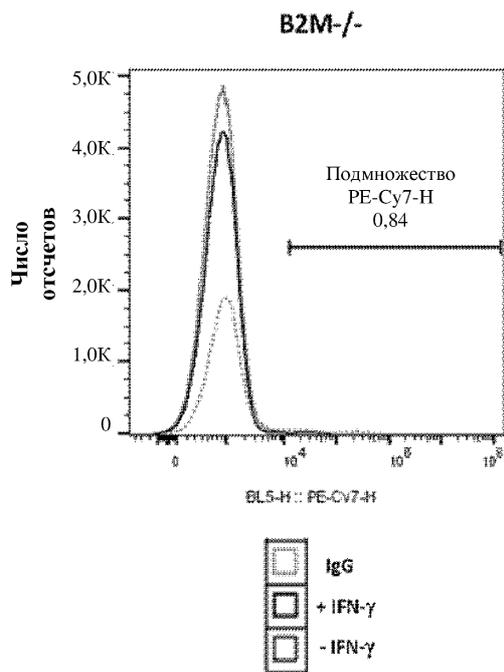
Фиг. 12В



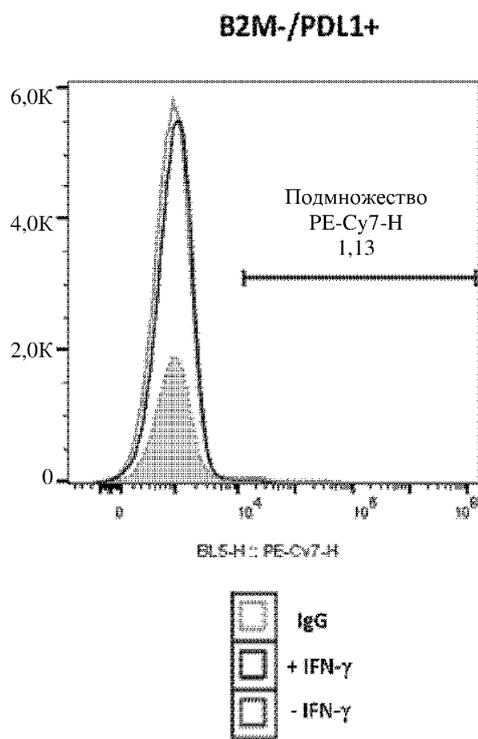
Фиг. 12C



Фиг. 12D

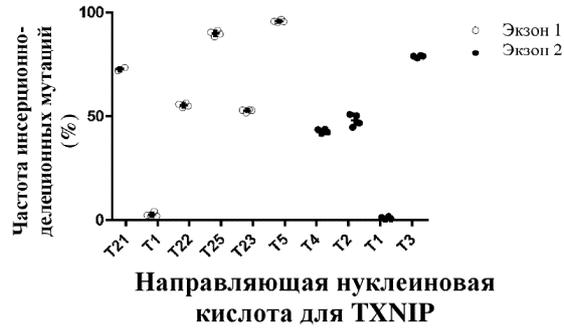


Фиг. 12E

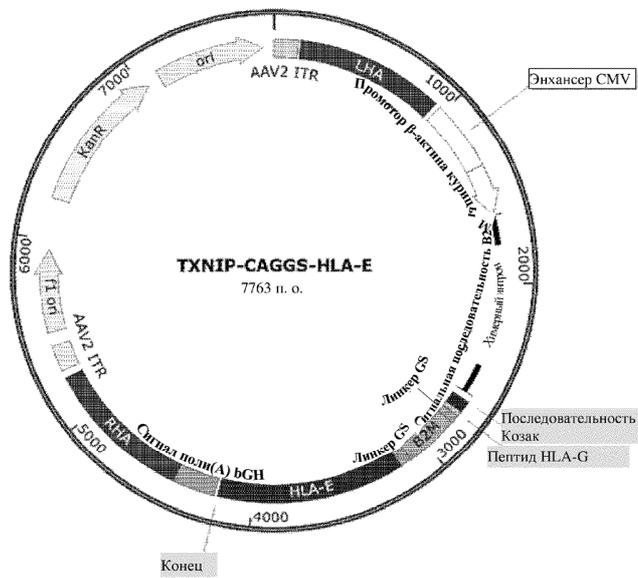


Фиг. 12F

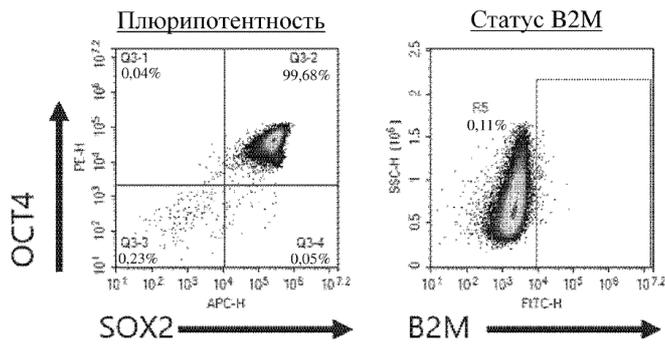
Скрининг направляющих нуклеиновых кислот для экзонов 1 и 2 TXNIP от Synthego



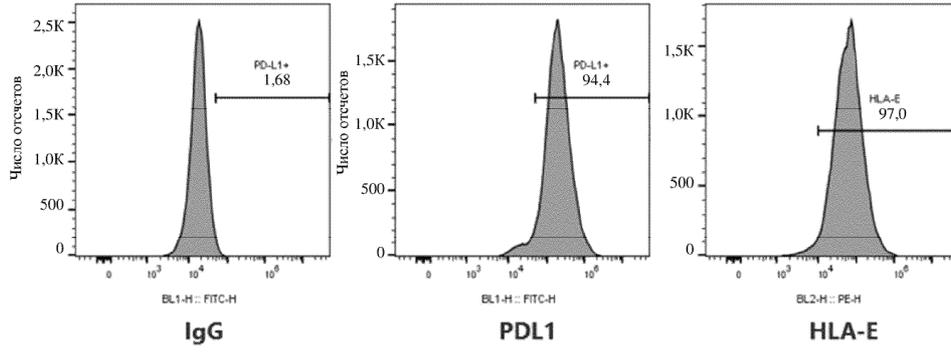
Фиг. 13



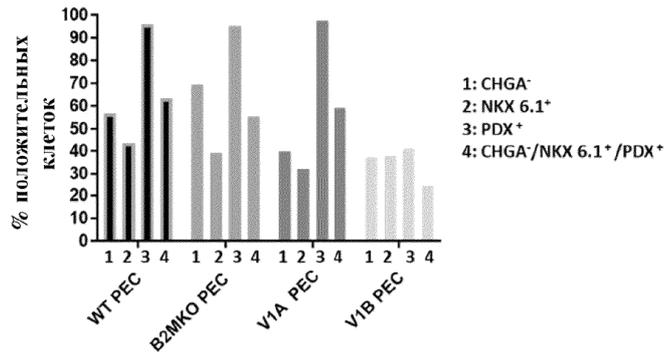
Фиг. 14



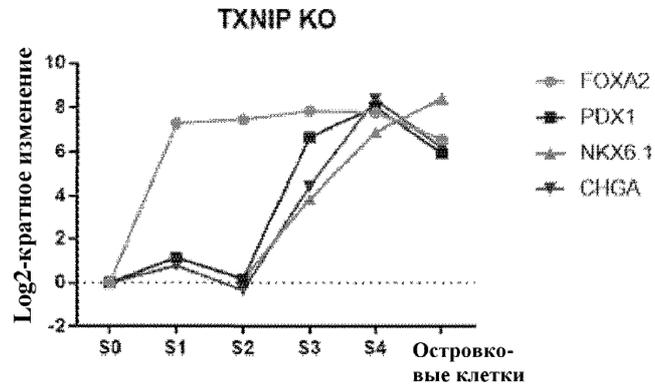
Фиг. 15



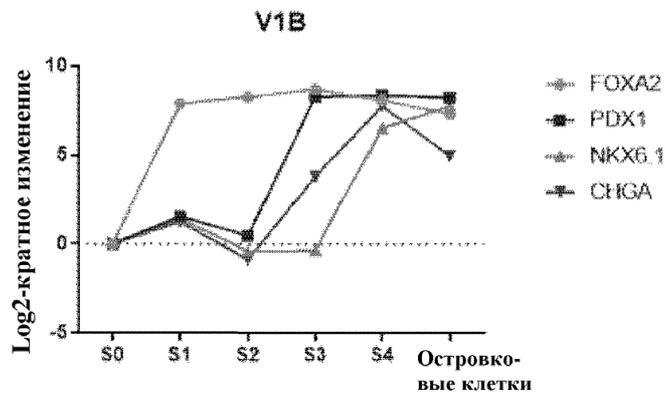
Фиг. 16



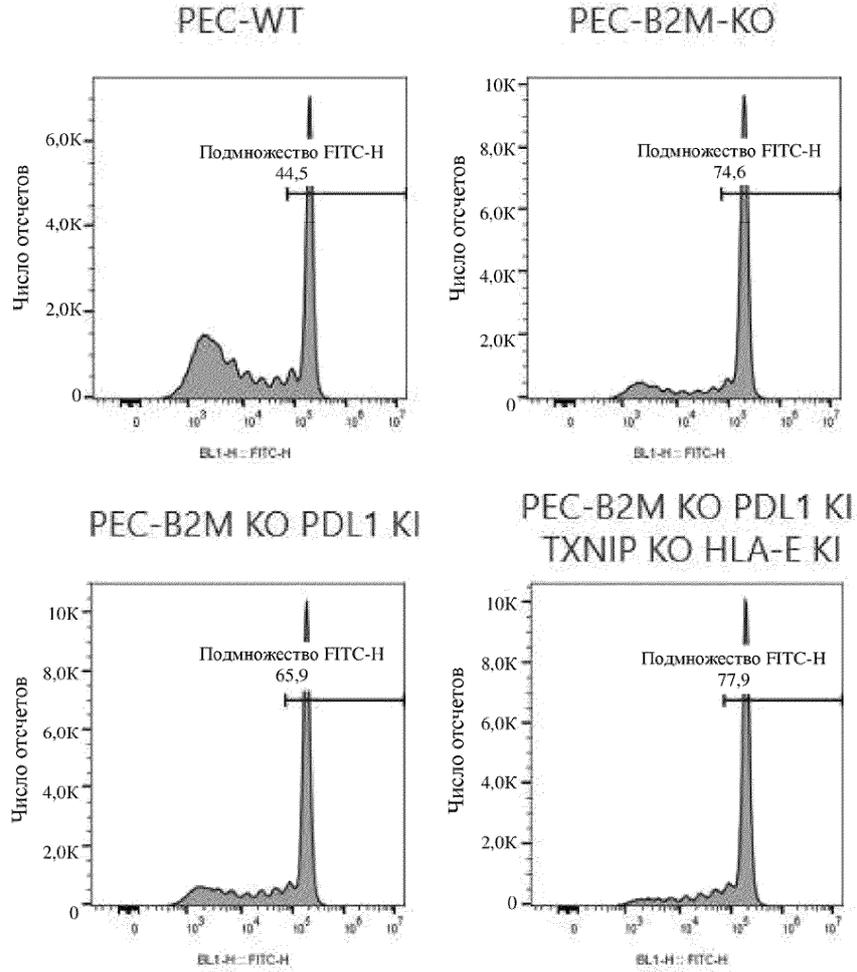
Фиг. 17



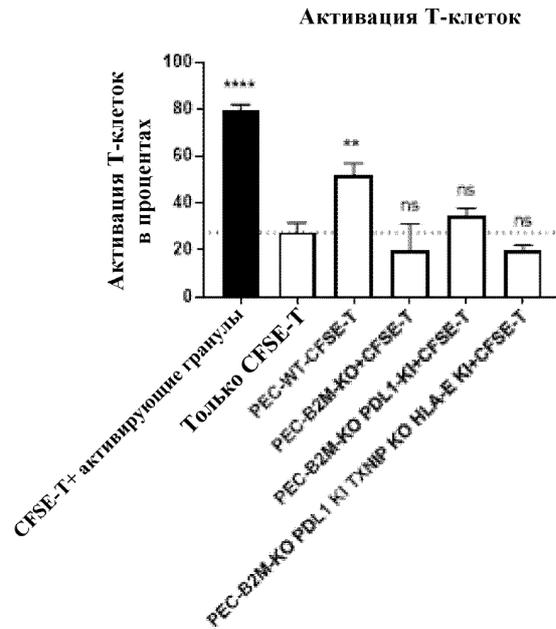
Фиг. 18А



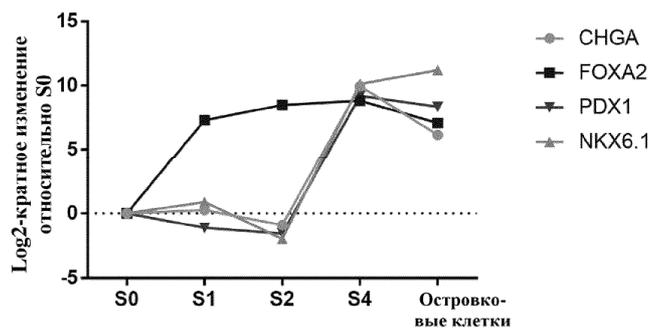
Фиг. 18В



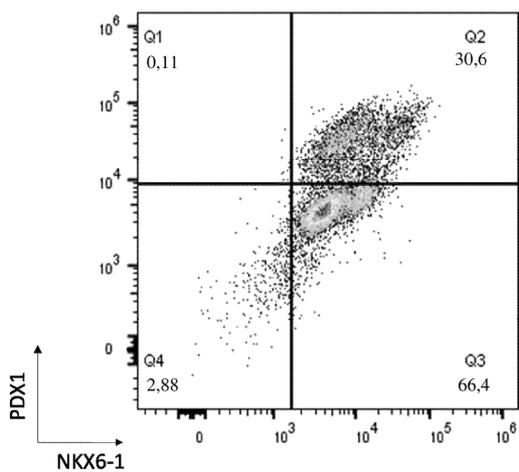
Фиг. 19А



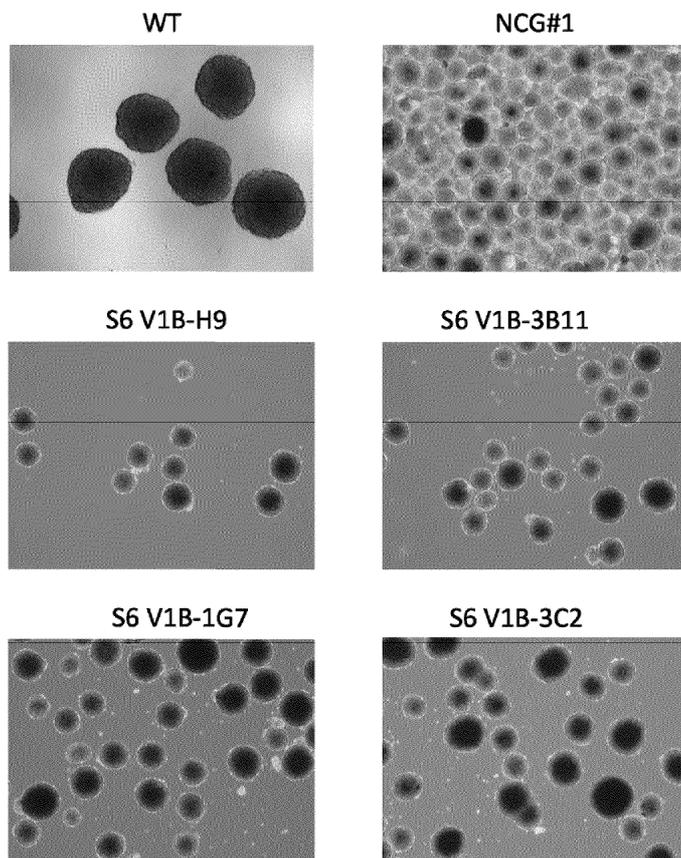
Фиг. 19В



Фиг. 20

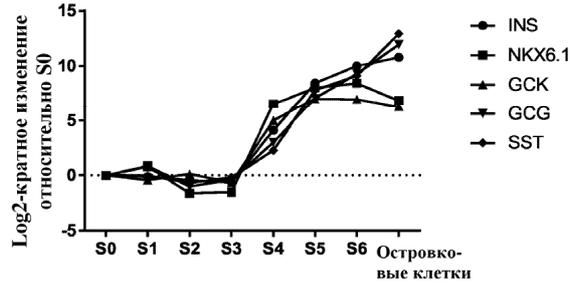


Фиг. 21



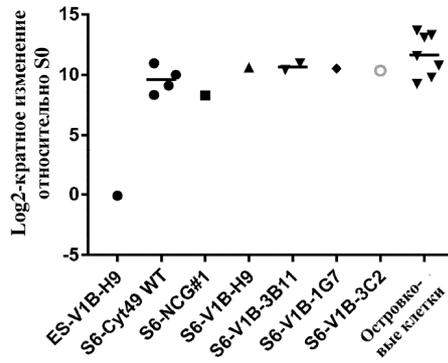
Фиг. 22

Дифференцировка до стадии S6  
во времени



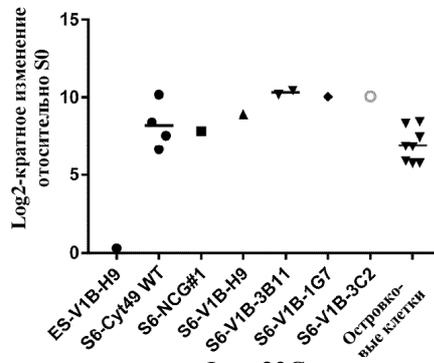
Фиг. 23А

INS – клетки на стадии S6



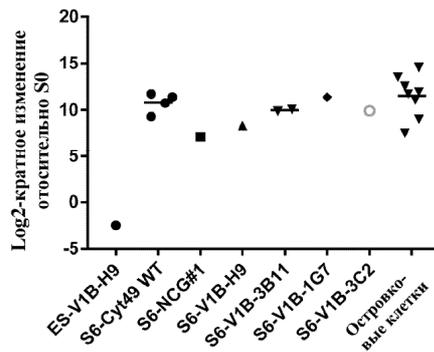
Фиг. 23В

NKX6.1 - клетки на стадии S

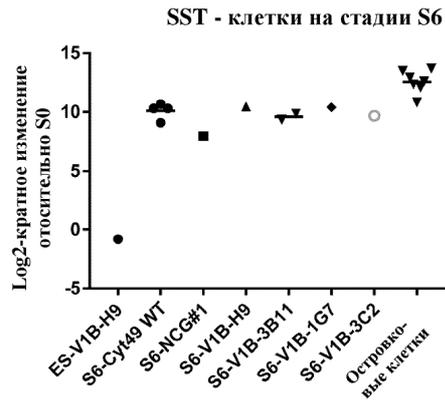


Фиг. 23С

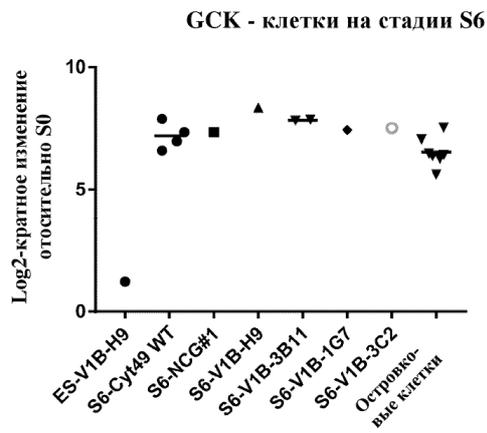
GCG – клетки на стадии S6



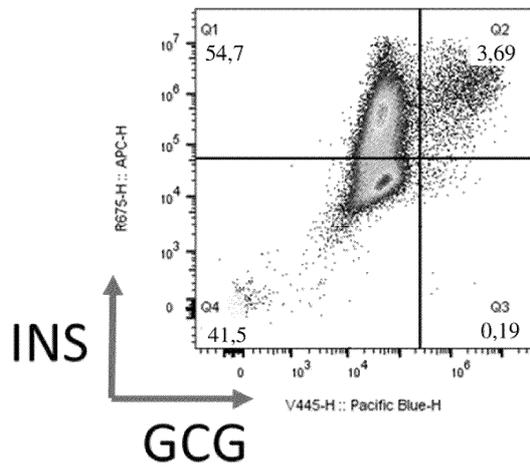
Фиг. 23D



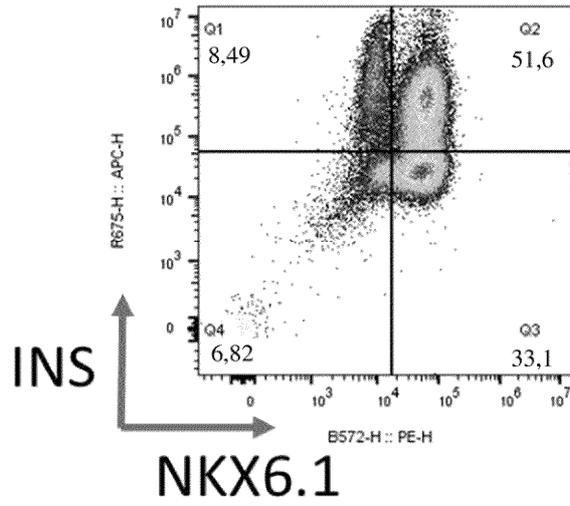
Фиг. 23Е



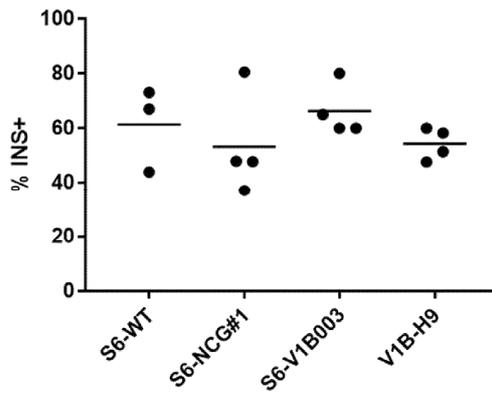
Фиг. 23F



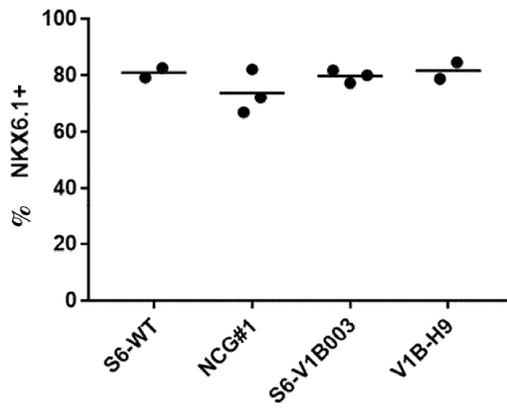
Фиг. 24А



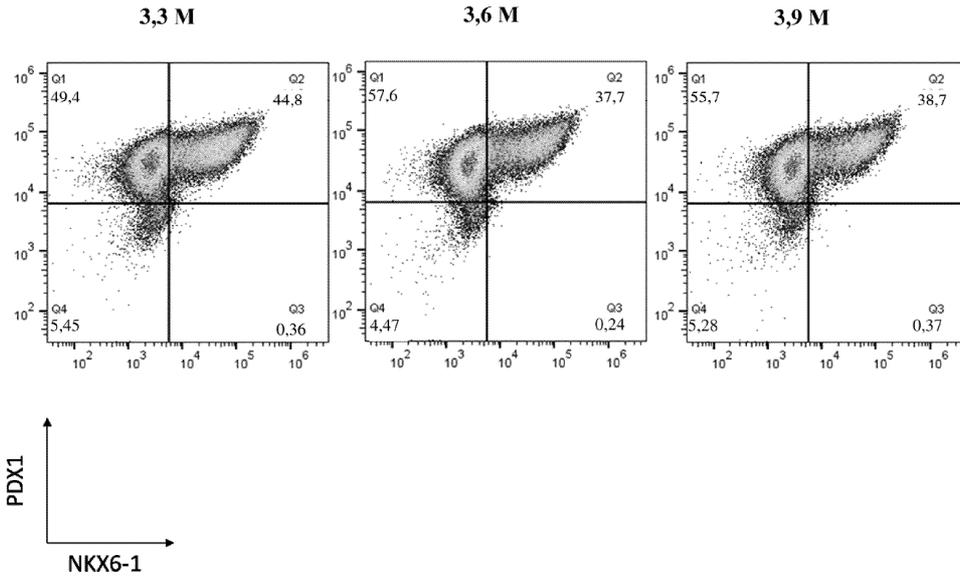
Фиг. 24В



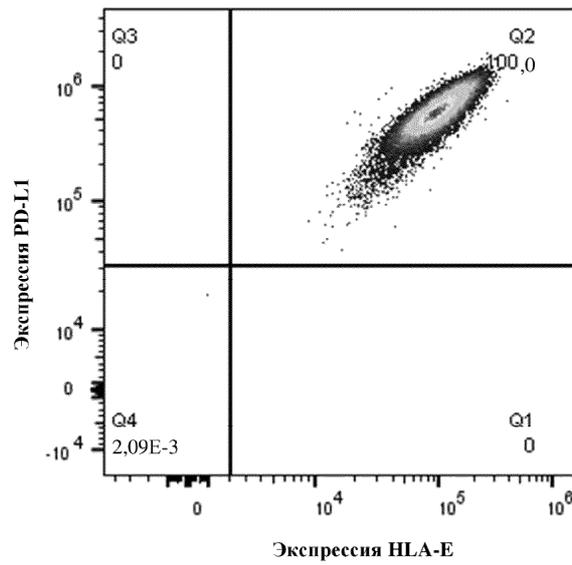
Фиг. 25А



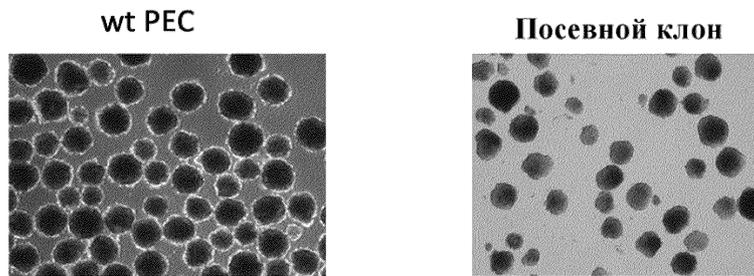
Фиг. 25В



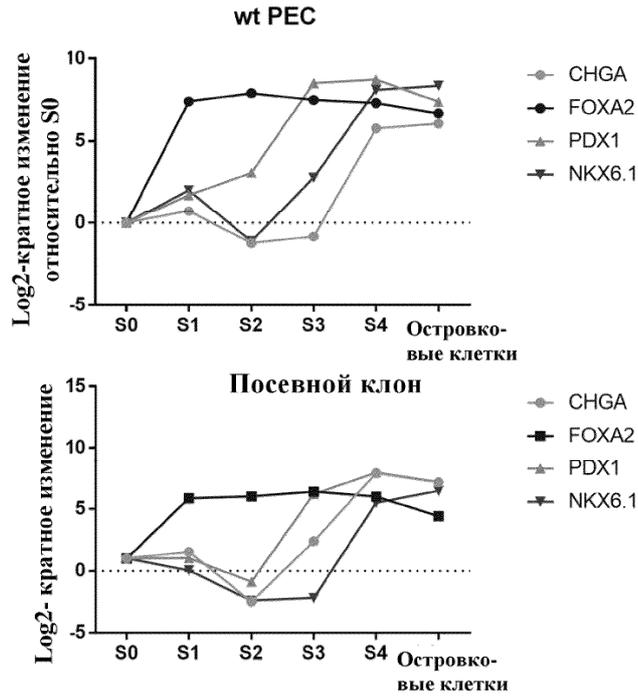
Фиг. 26А



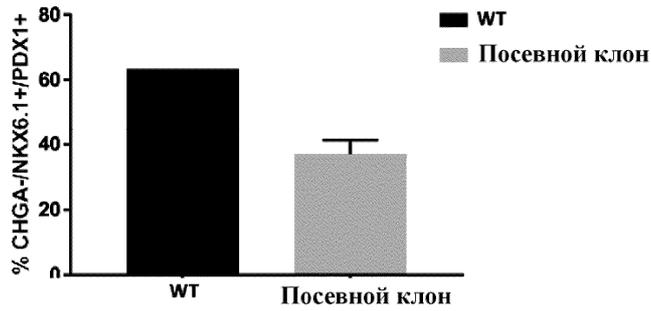
Фиг. 26В



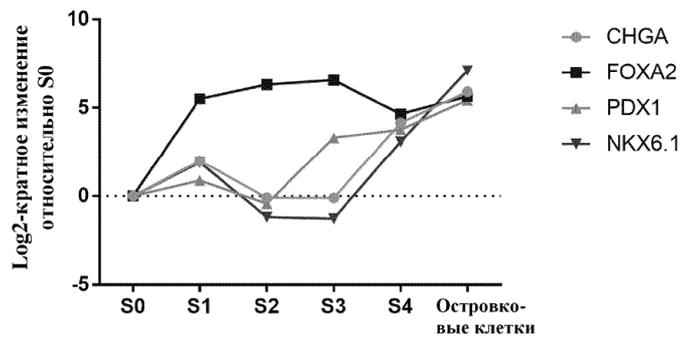
Фиг. 27А



Фиг. 27В



Фиг. 27С



Фиг. 28

