



МІНІСТЕРСТВО
ЕКОНОМІЧНОГО
РОЗВИТКУ І ТОРГІВЛІ
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) UA

(11) 118957

(13) C2

(51) МПК

C12N 5/071 (2010.01)

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

- (21) Номер заявки: **а 2015 01169**
- (22) Дата подання заявки: **29.08.2013**
- (24) Дата, з якої є чинними права на винахід: **10.04.2019**
- (31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: **61/694,693**
- (32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: **29.08.2012**
- (33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: **US**
- (41) Публікація відомостей про заявку: **10.07.2015, Бюл.№ 13**
- (46) Публікація відомостей про видачу патенту: **10.04.2019, Бюл.№ 7**
- (86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ: **PCT/US2013/057214, 29.08.2013**
- (72) Винахідник(и):
**Кост Грегорі Дж. (US),
Грегори Філіп Д. (US),
Гущин Дмитрій (US),
Холмс Майкл С. (US),
Міллер Джеффри С. (US),
Пашон Девід (US),
Ребар Едвард Дж. (US),
Рейк Андреас (US),
Урнов Фьодор (US),
Чжан Лей (US)**
- (73) Власник(и):
**САНГАМО БІОСАЙЄНСИЗ, ІНК.,
Point Richmond Tech Center, 501 Canal Blvd.,
Suite A100, Richmond, California 94804,
United States of America (US)**
- (74) Представник:
**Ошарова Ірина Олександрівна, реєстр.
№9**

- (56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:
WO 2010/030963 A2, 18.03.2010
Sankaran Vijay G et al: "Human fetal hemoglobin expression is regulated by the developmental stage-specific repressor BCL11A", Science, American association for the advancement of science, US, vol. 322, no. 5909, 19 December 2008 (2008-12-19), P. 1839-1842
Vijay G. Sankaran et al: "Developmental and species-divergent globin switching are driven by BCL11 A", NATURE, vol. 460, no. 7259, 5 August 2009 (2009-08-05), P. 1093-1097
Bauer D E et al: "Reawakening fetal hemoglobin: prospects for new therapies for the beta-globin disorders", Blood, American society of hematology, US, vol. 120, no. 15, 11 October 2012 (2012-10-11), P. 2945-2953
Daniel E Bauer et al: "Update on fetal hemoglobin gene regulation in hemoglobinopathies", Current opinion in pediatrics., vol. 23, no. 1, 1 February 2011 (2011 -02-01), P. 1 -8
Vittorio Sebastiano et al: "In Situ Genetic Correction of the Sick Cell Anemia Mutation in Human Induced Pluripotent Stem Cells Using Engineered Zinc Finger Nucleases", Stem cells., vol. 29, no. 11, 25 October 2011 (2011-10-25), P. 1717-1726
Fyodor D. Urnov et al: "Genome editing with engineered zinc finger nucleases", Nature reviews genetics, vol. 11, no. 9, 1 September 2010 (2010-09-01), P. 636-646
Ning Sun et al: "Optimized TAL effector nucleases (TALENs) for use in treatment of sickle cell disease", Molecular biosystems, vol. 8, no. 4, 1 January 2012 (2012-01-01), P. 1255
US 20100261271 A1, 14.10.2010
US 20120142062 A1, 07.06.2012.

(54) СПОСІБ І КОМПОЗИЦІЯ ДЛЯ ЛІКУВАННЯ ГЕНЕТИЧНОГО ЗАХВОРЮВАННЯ

(57) Реферат:

Винахід стосується генетично модифікованої клітини-попередник червоних клітин крові, яка характеризується геномною модифікацією у межах екзону 2 або екзону 4 BCL11A або у межах

UA 118957 C2

BCL11A-XL, виконаною після розщеплення у межах гену BCL11a нуклеазою "цинкові пальці" (ZFN), нуклеазою TALE (TALEN) або системою CRISPR/Cas. А також стосується способу зміни експресії глобінових генів у клітині *in vitro*.

Перехресні посилання на споріднені заявки

[0001] У цій заявці заявлено пріоритет за попередньою заявкою США № 61/694693, поданою 29 серпня 2012 року, опис якої включено до даного документу шляхом посилання в повному обсязі.

5 Галузь техніки

[0002] Даний винахід належить до галузі геномної інженерії гемопоетичних стовбурових клітин, особливо для лікування гемоглобінопатії.

Рівень техніки

10 [0003] Генна терапія має величезний потенціал для нової ери в медицині. Ці методики дозволяють лікувати захворювання, які до цього часу залишались невиліковними в межах стандартної медичної практики. Особливо перспективним напрямом є можливість генетично конструювати клітину таким чином, щоб у цій клітині експресувався продукт, який раніше не продукувався в цій клітині. Приклади використання цієї технології включають введення гена, що кодує новий терапевтичний білок, вставку кодуєчої послідовності, яка кодує білок, відсутній в клітині або у індивідуума, введення гена дикого типу в клітину, що містить мутантну генну послідовність, і вставку послідовності, яка кодує структурну нуклеїнову кислоту, таку як мікроРНК або міРНК.

20 [0004] Трансгени можуть доставлятися в клітину різними способами, за яких трансген інтегрується у власний геном клітини і підтримується там. В останні роки була розроблена стратегія інтеграції трансгена, яка використовує розщеплення сайт-специфічними нуклеазами для спрямованого введення у обраний геномний локус (див., наприклад, патент США № 7888121 того самого заявника). Нуклеази, специфічні до генів-мішеней, можуть використовуватись таким чином, що трансгенний конструкт вставляється шляхом гомологічно спрямованої репарації (HDR) або шляхом об'єднання кінців в процесі негомологічного з'єднання кінців (NHEJ). Локуси-мішені включають локуси "затишної гавані", наприклад, ген CCR5, ген CXCR4, ген PPP1R12C (також відомий як AAVS1), ген альбуміну або ген Rosa. Див., наприклад, патентні публікації США 20080299580; 20080159996; 201000218264; 20110301073; 20130177983 і 20130177960 і попередню заявку на патент США № 61/823689. Інтеграція, опосередкована нуклеазами, відкриває перспективу покращення експресії трансгенів, підвищення безпеки і тривалості експресії у порівнянні з класичними підходами до інтеграції, які спираються на випадкову інтеграцію трансгена, оскільки вона робить можливим точне позиціонування трансгена з мінімальним ризиком сайленсингу гена або активації сусідніх онкогенів.

35 [0005] Червоні клітини крові (ЧКК), або еритроцити, є основними клітинними компонентами крові. Насправді, ЧКК складають четверту частину клітин у людини. Зрілі ЧКК людини не мають ядра і багатьох інших органел у людей та заповнені гемоглобіном – металопротеїном ЧКК, що переносить кисень до тканин, а також переносить двоокис вуглецю з тканин назад до легень для видалення. Білок складає приблизно 97 % від сухої ваги еритроцитів і підвищує здатність крові переносити кисень приблизно у сімдесят разів. Гемоглобін є гетеротетрамером, що складається з двох α -подібних глобінових ланцюгів і двох β -подібних глобінових ланцюгів та 4 гемових груп. У дорослих $\alpha\beta$ 2 тетрамер називається гемоглобіном А (HbA) або дорослим гемоглобіном. Як правило, альфа- і бета- глобінові ланцюги синтезуються в приблизному співвідношенні 1:1, і це співвідношення, здається, має вирішальне значення в плані стабілізації гемоглобіну та ЧКК. Насправді, в деяких випадках, коли неадекватно експресується один тип гена глобіну (див. нижче), знижуючи експресію (наприклад, з використанням певної міРНК) іншого типу глобіну, відновлення цього співвідношення 1: 1 зменшує деякі аспекти мутантного клітинного фенотипу (див. Voon et al (2008) Haematologica 93(8):1288). У плоду, що розвивається, продукується інша форма гемоглобіну, фетальний гемоглобін (HbF), який має більш високу афінність зв'язування кисню, ніж гемоглобін А, так що кисень може доставлятися в систему дитини через кровоток матері. Фетальний гемоглобін також містить два α -ланцюги глобіну, але замість дорослих β -глобінових ланцюгів він має два фетальних γ -ланцюги глобіну (тобто, фетальний гемоглобін $\alpha\gamma$ 2). Приблизно на 30 тижні вагітності, синтез γ -глобіну у плоду починає падати, а продукування β -глобіну підвищується. По досягненні приблизно 10-місячного віку, гемоглобін новонародженого майже повністю являє собою $\alpha\beta$ 2, хоча певна кількість HbF зберігаються і в дорослому віці (приблизно 1-3 % від загальної кількості гемоглобіну).

55 Регулювання переходу від продукування γ до β є доволі складним, і в першу чергу включає інгібування експресії γ -глобіну з одночасною активацією експресії β -глобіну.

60 [0006] Генетичні дефекти в послідовностях, що кодують гемоглобінові ланцюги, можуть бути відповідальними за цілий ряд захворювань, відомих як гемоглобінопатії, включаючи серпоподібно-клітинну анемію та таласемії. У більшості пацієнтів з гемоглобінопатіями, гени, які кодують γ -глобін, залишаються в наявності, але експресія є відносно низькою через нормальну

генну репресію, яка відбувається напередодні пологів, як описано вище.

[0007] Вважається, що 1 на 5000 людей в США має серпоподібно-клітинну хворобу (СКХ), в основному це люди, які походять з Африки на південь від Сахари. Схоже, що там серпоподібно-клітинна гетерозиготність корисна для захисту від малярії, а відтак ця аномалія була селектована з часом, так що за оцінками в Африці на південь від Сахари одна третина населення має серпоподібно-клітинну аномалію еритроцитів. Серпоподібно-клітинна анемія спричинена мутацією в гені β -глобіну, в якому валін замінений на глутамінову кислоту в амінокислотному положенні 6 (GAG на GTG на рівні ДНК), де одержаний гемоглобін називають "гемоглобіном S" або "HbS". В умовах пониженого рівня кисню конформаційний зсув в бік дезокси-форми HbS приводить до експонування гідрофобної ділянки білка між спіралями E та F. Гідрофобні залишки валіну в положенні 6 бета-ланцюга гемоглобіну здатні зв'язуватись із гідрофобною ділянкою, спричиняючи агрегацію молекул HbS та утворення волокнистих преципітатів. Ці агрегати, в свою чергу, спричиняють аномалії або зміну форми ЧКК на серпоподібну, що призводить до втрати гнучкості клітинами. Утворені серпоподібні ЧКК більше не в змозі протиснутись в капілярне русло і можуть призвести до вазооклюзійної кризи у пацієнтів із серпоподібними клітинами. Крім того, серпоподібні ЧКК є менш стійкими до механічних впливів, ніж нормальні ЧКК, і, як правило, схильні до гемолізу, що, в свою чергу, призводить до анемії у пацієнта.

[0008] Лікування та ведення хворих із серпоподібно-клітинною анемією є позитивною проблемою, що включає лікування антибіотиками, усунення болю і переливання під час гострих епізодів. Один з підходів полягає у застосуванні гідроксисечовини, один з механізмів впливу якої полягає у підвищенні продуктування γ -глобіну. Довгострокові побічні ефекти хронічної терапії гідроксисечовиною на сьогодні невідомі, проте, лікування дає небажані побічні ефекти і може мати змінну ефективність в залежності від пацієнта. Незважаючи на підвищення ефективності лікування серпоподібних клітин, тривалість життя хворих, як і раніше, залишається на рівні середини-кінця 50-х років, і клінічні прояви хвороби мають глибокий вплив на якість життя пацієнта.

[0009] Таласемії також є захворюваннями, пов'язаними з гемоглобіном, і зазвичай включають знижену експресію ланцюгів глобіну. Це може відбуватись за рахунок мутацій в регуляторних ділянках генів або через мутації в кодуючій послідовності глобіну, що призводить до зниження експресії. Альфа-таласемії асоціюються з людьми, що походять із Західної Африки та Південної Азії, і можуть надавати резистентність до малярії. Бета-таласемія пов'язана з людьми середземноморського походження, як правило, з Греції та прибережних районів Турції та Італії. Лікування таласемій зазвичай включає переливання крові та хелатну терапію. Пересадка кісткового мозку також використовується для лікування людей з тяжкими таласеміями, якщо можна виявити придатного донора, але ця процедура може мати значні ризики.

[0010] Одним із запропонованих підходів для лікування СКХ та бета-таласемій, є підвищення експресії γ -глобіну з метою HbF-функціональної заміни аберантного дорослого гемоглобіну. Як згадувалось вище, лікування пацієнтів з СКХ гідроксисечовиною вважається успішним зокрема через її вплив на підвищення експресії γ -глобіну. Першою виявленою групою сполук, що впливають на реактивацію активності HbF, були цитотоксичні лікарські препарати. Здатність спричиняти синтез гама-глобіну de novo шляхом фармакологічних маніпуляцій вперше була показана з використанням 5-азацитину у експериментальних тварин (DeSimone (1982) Proc Natl Acad Sci USA 79(14):4428-31). Подальші дослідження підтвердили здатність 5-азацитину підвищувати HbF у пацієнтів з β -таласемією і серпоподібно-клітинною анемією (Ley, et al., (1982) N. Engl. J. Medicine, 307: 1469-1475, і Ley, et al., (1983) Blood 62: 370-380). Крім того, в експериментальних системах було показано, що коротколанцюгові жирні кислоти (наприклад, бутират і його похідні) підвищують рівень HbF (Constantoulakis et al., (1988) Blood 72(6):1961-1967). Також існує сегмент людської популяції з станом, відомим як «спадкова персистенція фетального гемоглобіну» (СПФГ), за якого підвищена кількість HbF зберігається у зрілому віці (10-40 % у гетерозиготних носіїв СПФГ (див. Thein et al (2009) Hum. Mol. Genet 18 (R2): R216-R223). Це рідкісний стан, але за відсутності будь-яких бета-глобінових аномалій, він призводить до значних клінічних проявів, навіть якщо 100 % гемоглобіну людини являє собою HbF. У людей, які мають бета-таласемію одночасно з СПФГ, експресія HbF може зменшити тяжкість захворювання. Крім того, тяжкість природного перебігу серпоподібно-клітинної анемії у різних пацієнтів може значно відрізнятись, і цю мінливість, зокрема, можна пов'язувати з тим, що деякі люди з легшою формою хвороби експресують більш високі рівні HbF.

[0011] Один з підходів до підвищення експресії HbF включає ідентифікацію генів, продукти яких відіграють важливу роль в регуляції експресії γ -глобіну. Одним з таких генів є BCL11A,

вперше виявлений через його роль в розвитку лімфоцитів. BCL11A кодує білок "цинкові пальці", який, як вважають, бере участь в регулюванні експресії γ -глобіну, залежному від стадії розвитку. BCL11A експресується в дорослих еритроїдних клітинах-попередниках, а інгібування його експресії приводить до підвищення експресії γ -глобіну. Крім того, було виявлено, що регуляція сплайсингу мРНК BCL11A здійснюється в залежності від стадії розвитку. Схоже, що в ембріональних клітинах експресуються переважно короткі варіанти мРНК BCL11A, відомі як BCL11A-S і BCL11A-XS, тоді як у зрілих клітинах експресуються переважно довші варіанти мРНК – BCL11A-L і BCL11A-XL. Див., Sankaran et al (2008) Science 322 p. 1839. Імовірно, білок BCL11A взаємодіє з β -глобіновим локусом, що приводить до зміни його конформації і тим самим – його експресії на різних стадіях розвитку. Крім того, інший регуляторний білок KLF1, очевидно, бере участь в регуляції експресії γ -глобіну. Було виявлено, що рівень KLF1 прямо пропорційний рівню BCL11A, і обидва обернено пропорційний рівню γ -глобіну. Наприклад, мальтійська родина з постійною експресією HbF сімейство несе також гетерозиготну мутацію гена KLF1 (Borg et al (2010) Nat Genet, 42(9):801-805). Очевидно, продукт гена KLF1 зв'язується безпосередньо з геном BCL11A in vivo, і, таким чином, може бути відповідальним за його активацію (див. Borg et al. там же; Bieker (2010) Nat Genet 42(9): 733-734; Zhou et al. (2010) Nat Genet 42(9):742-744). Таким чином, якщо KLF1 стимулює експресію BCL11A, то дія цього індукованого BCL11A приводить до пригнічення продукування γ -глобіну і HbF. Було запропоновано використання інгібуючої РНК, націленої на ген BCL11A (див., наприклад, патентну публікацію США № 20110182867), але ця технологія має декілька потенційних недоліків, а саме: повний нокаун гена може бути не досягнутий, доставка таких РНК може бути проблематичною, і РНК повинні бути наявні безперервно, що потребує численних процедур протягом життя.

[0012] Альфа-таласемії також широко розповсюджені у людській популяції, особливо в Азії, а один з типів аберацій альфа-глобіну, як вважається, є найбільш поширеним генетичним захворюванням людини. В тропічних і субтропічних районах світу альфа-глобінове порушення зустрічається у 80-90 % населення (див. Harteveld and Higgs (2010) Orphanet JouRNL of Rare Diseases 5:13).

[0013] Люди несуть дві копії гена альфа-глобіну в тандемі ($\alpha 1$ і $\alpha 2$) на хромосомі 16, а відтак в нормальній диплоїдній клітині загалом присутні 4 копії. Зазвичай на ген $\alpha 2$ припадає в 2-3 рази більше мРНК α -глобіну, ніж на ген $\alpha 1$. ТанDEMна організація цих двох генів може бути пов'язана з високою поширеністю великих делецій в альфа-глобінових генах у хворих на альфа-таласемію, при чому, як правило, кількість альфа-глобінових генів, які є нефункціональними, безпосередньо пов'язана з тяжкістю будь-якої альфа-таласемії (див. Chui et al (2003) Blood 101(3):791). Делеція однієї копії, очевидно, є досить поширеною (30 % афроамериканців і 60-80 % людей, які проживають в Саудівській Аравії, Індії та Таїланді), і, як правило, не виявляється у людини без проведення генетичного дослідження. Делеція двох копій, чи на одній хромосомі (cis) чи по одній копії на кожній з двох хромосом (trans), може призвести до легкої форми анемії у пацієнта. Коли видаляються три α -глобінових гени, так що індивід має лише один функціональний α -глобіновий ген, то спостерігається помірна анемія, але, що ще більш важливо, порушується вкрай важливе співвідношення α -глобіну і β -глобіну. Тетрамери $\beta 4$, які містять чотири бета-глобінових ланцюги, часто спостерігаються у пацієнтів, що мають тільки один функціональний альфа-глобіновий ген, стан, відомий як HbH. Тетрамери $\beta 4$ здатні зв'язувати кисень, але не вивільняють його на периферії, спричиняючи так звану хворобу HbH. Люди з хворобою HbH мають ЧКК із вкороченим періодом напіврозпаду, які легко піддаються гемолізу, що призводить до погіршення симптомів анемії. Втрата всіх чотирьох α -глобінових генів зазвичай призводить до смерті in utero.

[0014] Таким чином, існує потреба в додаткових способах і композиціях, які можуть бути використані для редагування геному з метою коригування аберантного гена або зміни експресії інших генів, зокрема, для лікування гемоглобінопатій, таких як серпоподібно-клітинна хвороба і таласемія.

Суть винаходу

[0015] В даному документі описані способи і композиції для зміни експресії або коригування одного або більше генів, що кодують білки, які беруть участь в генетичному захворюванні (наприклад, білкові продукти відсутні, наявні в недостатній кількості або аберантні при хворобі та/або білки, які регулюють ці білки), такому як серпоподібно-клітинна хвороба або таласемія. Зміна таких білків може привести до вилікування цих генетичних захворювань. Зокрема, геномне редагування використовують для коригування аберантного гена, вставки гена дикого типу або зміни експресії ендегенного гена. В якості необмежуючого прикладу ген дикого типу, що кодує β -глобін, може бути вставлений в клітину для продукування дефіцитного білка та/або лікування гемоглобінопатії, спричиненої пошкодженням β -глобіном. В деяких випадках ген дикого

типу може бути вставлений в локус "затишної гавані" або в локус, який, як відомо, інтенсивно експресується в цільовій тканині, як, наприклад, β -глобіновий локус в еритроїдних клітинах. Генотипне редагування може бути використане також для продукування білка, дефіцитного при альфа-таласемії (і тим самим – лікування) шляхом вставки альфа-глобінового гена дикого типу в локус "затишної гавані". Інший підхід передбачає використання коригування гена, за якого здійснюється заміна мутантної послідовності пошкодженого α - або β -глобінового гена. За іншого підходу, регуляторний ген, який бере участь в інгібуванні γ -глобіну, може бути змінений або «нокаутований» (наприклад, для збільшення експресії γ -глобіну шляхом інактивації та/або зниження кількості інгібіторного білка) та/або регуляторний сайт зв'язування, розміщений upstream від гена γ -глобіну або в інших ділянках бета-глобінового локусу, може бути змінений таким чином, що регулятори не можуть ефективно взаємодіяти в γ -глобіновому локусі, і продукується HbF, тим самим відмінюючи ефекти (тобто, СКХ або β -таласемію), спричинені абераційним β -глобіновим геном. Один з підходів додатково передбачає використання модифікації стовбурових клітин (наприклад, гемопоетичних стовбурових клітин або попередників ЧКК), після чого такі стовбурові клітини можуть бути використані для щеплення пацієнта з метою лікування гемоглобінопатії.

[0016] В одному аспекті в даному документі описаний білок «цинкові пальці» (ZFP), який зв'язується з сайтом-мішенню в цільовій ділянці (наприклад, β -глобіновий, α -глобіновий ген або ген «затишної гавані», або регуляторний ген або його ДНК-мішень, такі як BCL11A, γ -глобін або KLF1) в геномі, де ZFP містить один або більше сконструйованих зв'язуючих доменів «цинкових пальців». В одному варіанті реалізації винаходу ZFP є нуклеазою «цинкові пальці» (ZFN), яка розщеплює цільову геномну ділянку-мішень, де ZFN містить один або більше сконструйованих зв'язуючих доменів «цинкових пальців» і нуклеазний домен розщеплення або напівдомен розщеплення. Домени розщеплення або напівдомени розщеплення можуть бути одержані, наприклад, від різних рестрикційних ендонуклеаз та/або «хомінг»-ендонуклеаз. В одному варіанті реалізації винаходу напівдомени розщеплення одержують із рестрикційної ендонуклеази Типу IIS (наприклад, Fok I). В певних варіантах реалізації винаходу домен «цинкових пальців» розпізнає сайт-мішень в глобіновому гені або гені «затишної гавані». В певних варіантах реалізації винаходу домен «цинкових пальців» містить 5 або 6 доменів «цинкових пальців» і розпізнає сайт-мішень на глобіновому гені (наприклад, білок «цинкові пальці», що має 5 або 6 пальців з розпізнаючими спіральними ділянками, показаний в Табл. 1А). В іншому варіанті реалізації домен «цинкових пальців» розпізнає сайт-мішень в BCL11A, KLF1, α , β або γ -глобіновому гені або в їх регуляторних елементах. В певних варіантах реалізації винаходу домен «цинкових пальців» містить 5 або 6 доменів «цинкових пальців» і розпізнає сайт-мішень в BCL11A, KLF1, α , β і γ -глобіновому гені або в їх регуляторних елементах (наприклад, білок «цинкові пальці», що має 5 або 6 пальців з розпізнаючими спіральними ділянками, показаний в Табл. 1А).

[0017] В іншому аспекті в даному документі описаний білок TALE (подібний до активатора транскрипції), який зв'язує сайт-мішень в цільовій ділянці (наприклад, α або β -глобіновий ген або ген «затишної гавані», або регуляторний ген або його ДНК-мішень, таку як BCL11A, γ -глобін або KLF1) в геномі, де TALE містить один або більше сконструйованих зв'язуючих доменів TALE. В одному варіанті реалізації винаходу TALE є нуклеазою (TALEN), яка розщеплює цільову геномну ділянку-мішень, де TALEN містить один або більше сконструйованих TALE ДНК-зв'язуючих доменів і нуклеазний домен розщеплення або напівдомен розщеплення. Домени розщеплення і напівдомени розщеплення можуть бути одержані, наприклад, від різних рестрикційних ендонуклеаз та/або «хомінг»-ендонуклеаз. В одному варіанті реалізації винаходу напівдомени розщеплення одержані від рестрикційної ендонуклеази Типу IIS (наприклад, Fok I). В певних варіантах реалізації винаходу TALE ДНК-зв'язуючий домен розпізнає сайт-мішень в глобіновому гені або гені «затишної гавані». В інших варіантах реалізації TALE ДНК-зв'язуючий домен розпізнає сайт-мішень в BCL11A, KLF1, α , β або γ -глобіновому гені або в їх регуляторних елементах (наприклад, білок TALEN, показаний в Табл. 3).

[0018] В іншому аспекті в даному документі описана система CRISPR/Cas, яка зв'язує сайт-мішень в цільовій ділянці (наприклад, ген з високим рівнем експресії, пов'язаний з хворобою ген або ген «затишної гавані») в геномі, де система CRISPR/Cas містить нуклеазу CRISPR/Cas і сконструйовану crPHK/tracrPHK (або одиничну гідову PHK). В певних варіантах реалізації винаходу система CRISPR/Cas розпізнає сайт-мішень в гені з високим рівнем експресії, зв'язаному з хворобою гені і гені «затишної гавані». В певних варіантах реалізації винаходу система CRISPR/Cas розпізнає сайт-мішень в глобіновому, альбуміновому, CCR5, CXCR4, AAVS1, Rosa або HPRT гені.

[0019] ZFN, TALEN та/або система CRISPR/Cas, як описано в даному документі, можуть

зв'язуватись з та/або розщеплювати цільову ділянку в кодуючій або некодуючій ділянці в межах гена або суміжних з ним ділянках, таку як, наприклад, лідерна послідовність, трейлерна послідовність або інтрон, або в межах ділянки, що не транскрибується, upstream або downstream від кодуючої ділянки. В певних варіантах реалізації винаходу ZFN, TALEN та/або система CRISPR/Cas зв'язується з та/або розщеплює глобіновий ген. В інших варіантах реалізації ZFN, TALEN та/або система CRISPR/Cas зв'язується з та/або розщеплює ген «затишної гавані», наприклад, ген CCR5, ген CXCR4, ген PPP1R12C (також відомий як AAVS1), альбуміновий ген або ген Rosa. Див., наприклад, патентні публікації США № 20080299580; 20080159996; 201000218264; 20110301073; 20130177983 і 20130177960 і попередню заявку на патент США № 61/823689. Крім того, з метою селекції може бути використаний локус HPRT (див. патентну публікацію США № 20130122591). В іншому аспекті в даному документі описані композиції, що містять одну або більше нуклеаз «цинкові пальці» та/або TALE або систему CRISPR/Cas, як описано в даному документі. В деяких варіантах реалізації винаходу ZFN, TALEN та/або система CRISPR/Cas зв'язується з і розщеплює BCL11A, KLF1, α , β або γ -глобіновий ген або розщеплює їх регуляторні елементи. В іншому аспекті в даному документі описані композиції, що містять одну або більше нуклеаз «цинкові пальці», TALE або Cas, як описано в даній заявці.

[0020] В іншому аспекті в даному документі описаний полінуклеотид, що кодує одну або більше ZFN, TALEN та/або систему CRISPR/Cas, як описано в даному документі. В деяких аспектах, мПНК може бути хімічно модифікованою (див., наприклад, Kormann et al, (2011) Nature Biotechnology 29(2):154-157).

[0021] В іншому аспекті в даному документі описаний вектор експресії ZFN, TALEN та/або системи CRISPR/Cas, що містить полінуклеотид, що кодує одну або більше ZFN, TALEN та/або систему CRISPR/Cas, описані в даному документі, функціонально зв'язаний з промотором. В одному варіанті реалізації винаходу вектором експресії є вірусний вектор.

[0022] В одному аспекті в даному документі описаний білок ZFN, TALEN та/або системи CRISPR/Cas, який використовується для розщеплення ДНК-мішені.

[0023] В інших аспектах, генетично модифіковані попередники ЧКК (гемопоетичні стовбурові клітини, відомі як "HSC") надаються в трансплантаті кісткового мозку, а ЧКК диференціюють і дозрівають *in vivo*. В деяких варіантах реалізації винаходу HSC виділяють після G-CSF-індукованої мобілізації, а в інших, клітини виділяють з кісткового мозку людини або пуповини. В деяких аспектах, HSC редагують за допомогою обробки нуклеазою, розробленою для «нокаутування» регулятора експресії глобіну (наприклад, BCL11A або KLF1). В інших аспектах, HSC модифікують з сконструйованою нуклеазою, а донорську нуклеїнову кислоту, таку як ген дикого типу (наприклад, глобіновий ген), вставляють і експресують та/або коригують ендегенний аберантний ген. В деяких випадках, генна послідовність дикого типу для вставки кодує β -глобін дикого типу або α -глобін дикого типу. В інших випадках, ендегенний аберантний ген є β -глобіновим або α -глобіновим геном. В деяких варіантах реалізації винаходу модифіковані HSC вводять пацієнту після м'якого мієлоабляційного попереднього кондиціювання. В інших аспектах, HSC вводять після повної мієлоабляції, так що після приживлення 100 % гемопоетичних клітин отримують від модифікованих HSC.

[0024] В іншому аспекті в даному документі описаний спосіб розщеплення ендегенного гена (наприклад, гена, інактивація якого приводить до підвищення експресії гама-глобіну, такого як BCL11A або KLF1) в клітині-попередниці ЧКК, спосіб, який включає: введення в клітину одного або більше полінуклеотидів, що кодують ZFN, TALEN та/або систему CRISPR/Cas, які зв'язують сайт-мішень в одному або більше ендегенних генах таким чином, що експресується ZFN(и), TALEN(и) та/або система CRISPR/Cas, а один або більше генів розщеплюються. В іншому аспекті в даному документі описаний спосіб розщеплення гена BCL11A або KLF1 в клітині, спосіб, який включає: введення в клітину одного або більше полінуклеотидів, що кодують ZFN, TALEN та/або систему CRISPR/Cas, які зв'язують сайт-мішень в одному або більше генах BCL11A або KLF1 таким чином, що експресується ZFN(и), TALEN(и) та/або система CRISPR/Cas, а один або більше генів BCL11A або KLF1 розщеплюються. В певних варіантах реалізації винаходу домен «цинкових пальців» містить 5 або 6 «цинкових пальців» і розпізнає сайт-мішень в глобіновому гені (наприклад, білок «цинкові пальці», що має 5-6 пальців з розпізнаючими спіральними ділянками, показаний в Табл. 1A). В інших варіантах реалізації винаходу TALEN розпізнає сайт-мішень в β -глобіновій, α -глобіновій, γ -глобіновій, KLF або BCL11A послідовності (показані в Табл. 3). В ще інших варіантах реалізації винаходу система CRISPR/Cas розпізнає сайт-мішень в β -глобіновій, α -глобіновій, γ -глобіновій, KLF або BCL11A послідовності, в якій одинична гдова РНК сконструйована для розпізнавання цільового сайту-мішені в гені-мішені, що становить інтерес. Розщеплений ген(и) може бути інактивованим

(«нокаутованим»), наприклад, «нокаутований» один або більше генів, чиї продукти можуть інгібувати експресію гена (наприклад, глобінового гена), або порушеним в регуляторному сайті-мішені на ДНК таких білків. В деяких варіантах реалізації винаходу інактивовані ген(и) або його послідовності-мішені є тими, що беруть участь в інгібуванні експресії фетального гемоглобіну. Диференційовані клітини (наприклад, стовбурові клітини) містять фетальний гемоглобін і можуть бути корисними для пацієнтів, які його потребують. В деяких варіантах реалізації винаходу глобіновий ген є «нокаутованим». Наприклад, альфа-глобіновий ген може бути «нокаутованим» для відновлення співвідношення альфа-глобіну і бета-глобіну, коли бета-глобін слабо експресується, або HbS, що кодує бета-глобіновий ген, може «нокаутуватись» одночасно з введенням бета-глобіну дикого типу. Клітини (наприклад, стовбурові клітини), коли диференційовані, будуть містити HbA гемоглобін HbA і можуть даватись пацієнтам, які того потребують.

[0025] В іншому аспекті в даному документі описаний спосіб вставки послідовності в ендегенний ген (наприклад, бета-глобіновий, альфа-глобіновий ген та/або ген «затишної гавані») в клітині (наприклад, стовбуровій клітині), спосіб, який включає розщеплення ендегенного гена з використанням однієї або більше нуклеаз і вставку послідовності в сайт розщеплення. В певних варіантах реалізації винаходу геномна послідовність в будь-якому гені-мішені заміщується, наприклад, з використанням пари ZFN або TALEN або системи CRISPR/Cas (або вектора, що кодує вказані ZFN, TALEN та/або систему CRISPR/Cas), як описано в даному документі, «донорською» послідовністю (також відомою як «трансген»), яка вставляється в ген після наміченого розщеплення ZFN, TALEN та/або системою CRISPR/Cas. Донорська послідовність може бути присутньою у векторі ZFN або TALEN, присутньою в окремому векторі (наприклад, векторі Ad, AAV або LV) або, як альтернатива, може вводиться в клітину з використанням різних механізмів доставки нуклеїнових кислот. Така вставка донорської нуклеотидної послідовності в локус-мішень (наприклад, глобіновий ген, інший ген «затишної гавані» і т. п.) приводить до експресії трансгена під контролем генетичних контрольних елементів локуса-мішені (наприклад, глобіну). В деяких варіантах реалізації винаходу трансген кодує некодуючу РНК (наприклад, кшРНК). Експресія трансгена перед дозріванням ЧКК може призвести до ЧКК, що містять цільову некодуючу РНК.

[0026] В інших варіантах реалізації винаходу трансген містить функціональний білок, наприклад, глобіновий білок (наприклад, бета та/або гама-глобін дикого типу). В деяких варіантах реалізації винаходу вставка цільового трансгена в ендегенний ген (наприклад, глобіновий ген), приводить до експресії інтактною екзогенною білковою послідовністю та відсутності будь-якої послідовності, що кодується ендегенним геном. В інших варіантах реалізації винаходу експресований ендегенний білок є злитим білком і містить амінокислоти, що кодуються трансгеном і глобіновим геном (наприклад, від ендегенного локуса-мішені або, як альтернатива, від глобін-кодуючих послідовностей на трансгені). В деяких випадках, глобіновим геном є бета-глобіновий ген, тоді як в інших випадках глобіновим геном є альфа-глобіновий ген. В інших випадках, глобіновим геном є гама-глобіновий ген. Коли наявні, ендегенні глобінові послідовності можуть бути присутніми на аміно (N)-кінцевій частині екзогенного білка та/або карбокси (C)-кінцевій частині екзогенного білка. Глобінові послідовності можуть включати непроцесовані глобінові послідовності дикого типу або мутантні глобінові послідовності або, як альтернатива, можуть включати частково глобінові кодуючі послідовності. В деяких варіантах реалізації винаходу злиття глобін-трансген локалізується в ендегенному локусі в межах клітини, тоді як в інших варіантах реалізації глобін-трансген кодуюча послідовність вставляється в «затишну гавань» в межах геному. В деяких аспектах, «затишну гавань» вибирають з гена CCR5, гена CXCR4, гена PPP1R12C (також відомого як AAVS1), альбумінового гена або гена Rosa. Див., наприклад, патентні публікації США № 20080299580; 20080159996; 201000218264; 20110301073; 20130177983 і 20130177960 і попередню заявку на патент США № 61/823689. Крім того, з метою селекції може бути використаний локус HPRT (див. патентну публікацію США № 20130122591).

[0027] В ще іншому аспекті в даному документі передбачені клітинні лінії та/або трансгенні тваринні моделі (системи). В деяких варіантах реалізації винаходу трансгенна клітина включає та/або тварина включає трансген, який кодує людський ген. В деяких випадках, трансгенна тварина містить «нокаут» в ендегенному локусі, що відповідає екзогенному трансгена (наприклад, мишачий глобіновий ген «нокаутується», а людський глобіновий ген вставляється в мишачий), тим самим роблячи можливим розвиток in vivo системи, де людський білок може бути вивчений окремо. Такі трансгенні моделі можуть бути використані з метою скринінгу для ідентифікації невеликих молекул або великих біомолекул, або інших об'єктів, які можуть взаємодіяти з або модифікувати цільовий людський білок. В деяких аспектах, трансген

інтегрується у обраний локус (наприклад, глобіновий або «затишної гавані») в стовбуровій клітині (наприклад, ембріонній стовбуровій клітині, індукованій плюрипотентній клітині, гемопоетичній стовбуровій клітині і т. п.) або в ембріон тварини, одержаний за будь-яким способом, описаним в даному документі, а потім ембріон імплантується таким чином, щоб народилась жива тварина. В інших аспектах, стовбурові клітини містять геномні альтерації в ендогенних локусах, таких як гени BCL11A, KLF1 або γ -глобіну, або їх комбінації, так що підвищується експресія γ -глобіну. В деяких варіантах реалізації винаходу підвищення експресії γ -глобіну змінює співвідношення γ -глобіну до β -глобіну в клітині у порівнянні з нередагованою стовбуровою клітиною. Тварину потім вигодовують до статевої зрілості і дозволяють дати потомство, в якому, принаймні, деякі з потомства містять редаговану ендогенну генну послідовність або інтегрований трансген.

[0028] В ще додатковому аспекті в даному документі передбачений спосіб сайт-специфічної інтеграції послідовності нуклеїнової кислоти в ендогенний локус (наприклад, глобіновий або «затишної гавані») хромосоми, наприклад, в хромосому ембріона. В певних варіантах реалізації винаходу спосіб включає: (а) ін'єкцію ембріона (і), принаймні, одним ДНК-вектором, де ДНК-вектор містить upstream-послідовність і downstream-послідовність, які фланкують послідовність нуклеїнової кислоти, яка буде інтегруватись, і (ii), принаймні, однією молекулою РНК, що кодує нуклеазу «цинкових пальців», TALE або Cas9. У випадку використання білка Cas9, також вводиться sgРНК. Нуклеаза або нуклеазна система розпізнає сайт-мішень в локусі-мішені (наприклад, глобіновому локусі або локусі «затишної гавані»), а потім (б) культивують ембріон, щоб зробити можливою експресію нуклеази «цинкові пальці» або TALE або системи CRISPR/Cas, де дволанцюговий розрив, введений в мішень за допомогою нуклеази «цинкові пальці», TALEN або системи CRISPR/Cas, потім відновлюють шляхом гомологічної рекомбінації з ДНК-вектором з тим, щоб включити послідовність нуклеїнової кислоти в хромосому.

[0029] В будь-якому із способів, описаних в даному документі, полінуклеотид, що кодує нуклеазу(и) «цинкові пальці», TALEN(и) та/або систему CRISPR/Cas, може містити ДНК, РНК або їх комбінацію. В певних варіантах реалізації винаходу полінуклеотид містить плазмід. В інших варіантах реалізації винаходу полінуклеотид, що кодує нуклеазу, містить мРНК.

[0030] Також передбачений набір, що містить ZFP, TALEN та/або систему CRISPR/Cas згідно винаходу. Набір може містити нуклеїнові кислоти, що кодують ZFP, TALEN та/або систему CRISPR/Cas (наприклад, молекули РНК або гени, що кодує ZFP, TALEN або Cas9, що містяться в придатних векторах експресії), і сконструйовану sgРНК, якщо необхідно, або аліквоти нуклеазних білків, молекул-донорів, придатних ліній клітин-хазяїв, інструкції щодо виконання способів згідно винаходу і т.п.

[0031] Ці та інші аспекти будуть очевидними для фахівців у даній галузі в світлі розкриття в цілому.

Короткий опис графічних матеріалів

[0032] На Фіг. 1 зображене вирівнювання генної послідовності β -подібного глобіну в ділянці, що оточує мутацію серпоподібно-клітинної хвороби (вказана на Фігурі). Показані (від верхнього рядку до нижнього рядку) послідовності бета-гемоглобіну з серпоподібно-клітинною мутацією (HBB-серп, SEQ ID NO: 1); гемоглобіну бета (HBB, SEQ ID NO: 2); гемоглобіну дельта (HBD, SEQ ID NO: 3); псевдогена бета-гемоглобіну (HBBP1, SEQ ID NO: 4); гемоглобіну іпсилон (HBE1, SEQ ID NO: 5), гемоглобіну гама-1 (HBG1, SEQ ID NO: 6) і гемоглобіну гама-2 (HBG2, SEQ ID NO: 7). Результати аналізу активності Cel I наведені нижче вирівнювання для вказаних п'яти пар ZFN.

[0033] На Фіг. 2, панелі А і В, показані гелі, що зображують вставку послідовності вказаного β -глобінового донору в клітинах CD34+. На Фіг. 2А (RFLP) зображена вставка послідовності вказаного β -глобінового донору, де вставка перевіряється за присутністю нового сайту рестрикції, наявного на донорській ДНК. На Фіг. 2В показані результати аналізу невідповідності Cel-1 (Surveyor™, Transgenomic), що підтверджують наявність нових послідовностей, які утворюють невідповідність. Відсоток алелей, що несуть мутацію (% NHEJ), вказаний в тексті справа від гелів (перший стовпчик, що відповідає номеру смуги на гелі). Цифри належать до комбінацій ZFN; unt: нетрансфікований контроль.

[0034] Фіг. 3 являє собою графічне зображення ролі, яку KLF1 і BCL11A відіграють в регуляції експресії генів β і гама-глобіну. Експресія KLF1 стимулює експресію як генів BCL11a, так і β -глобіну. Білок BCL11A пригнічує експресію гама-глобіну.

[0035] На Фіг. 4, панелі А-Е, зображені гелі, що показують результати аналізу Cel 1, як описано вище, після обробки HSC вказаними BCL11A- (Фіг. 4А), KLF1- (Фіг. 4С і 4D) або HPRT- (Фіг. 4В) специфічними ZFN і обробки трансдукованих клітин короткотривалим гіпотермічним шоком (30°) або за стандартних умов (37°). ДНК збирали через 3 дні після трансфекції. На Фіг.

4E показаний той самий тип аналізу Cel 1, проведений з зразками, зібраними через 3 дні після трансфекції HSC або через 17 днів після еритроїдного диференціювання. Відсоток алелей, що несуть мутацію (% NHEJ), вказується знизу на доріжках, а ідентичність використаних пар ZFN вказується на кожній Фігурі.

5 [0036] На Фіг. 5, панелі A і B, зображена експресія гама-глобіну у порівнянні з бета-глобіном (Фіг. 5A) або мРНК гама-глобіну, скоригована за стандартом 18s рРНК (Фіг. 5B) на 7 або 17 день після диференціювання, як проаналізовано за допомогою процедури TaqMan®. Відсоток мРНК гама-глобіну у порівнянні з мРНК гама+бета-глобіну показаний вище кожної смуги на Фіг. 5A. На Фіг. 5B, відносний рівень гама-глобіну, який нормований за 18s рРНК, зображений вище смуг і демонструє, що рівень мРНК гама-глобіну відносно 18S вище в клітинах, які були оброблені за допомогою BCL11A-специфічних ZFN.

10 [0037] На Фіг. 6 вказана кількість мРНК гама-глобіну в метилцелюлозних колоніях, одержаних від HSC, в залежності від генотипу клітин. Клітини, в яких обидва гени BCL11A є дикого типу ("BB"), продукують найменшу кількість мРНК гама-глобіну у порівнянні з клітинами, які мали одну BCL11A-нокаутну алель ("BB") або мали обидві нокаутні алелі ("нокаут"). Цифри над смугами вказують відсоток гама-глобіну, одержаний із сумарного бета-глобіну.

20 [0038] На Фіг. 7 показана серія послідовностей ДНК (SEQ ID NO: 140-148) в ділянці, розташованій upstream від гена гама-глобіну, після обробки гама-глобін-специфічними ZFN в клітинах K562. Послідовності мають ряд вставок і делецій, включаючи делецію 13 п.о. ("Δ13 п.о."), які ідентичні одному з людських генотипів, асоційованих з СПФГ. "Стандартна" послідовність зверху є послідовністю 5'-регуляторної ділянки дикого типу для гама-глобіну. Сайти зв'язування пари ZFN виділені червоним кольором, делеція 13 п.о. природного походження підкреслена.

25 [0039] На Фіг. 8, панелі від A до C, зображений Taqman-аналіз еритроїдних колоній, одержаних від HSC, оброблених ZFN, націлюючих гама-глобіновий промотор, після чого відбувається осадження на метилцелюлозних колоніях. Число колоній вказане в нижній частині кожної смуги, як і генотип. На Фіг. 8A показані відносні співвідношення гама/бета-глобінових мРНК; На Фіг. 8B показані рівні гама-глобінових мРНК, скориговані за рівнями 18s рРНК, а на Фіг. 8C показаний відповідний аналіз рівнів бета-глобіну, скоригований за 18s. Порівняння середніх значень співвідношень для дикого типу і мутантних колоній демонструє, що рівні гама-глобіну в колоніях з ZFN-індукованими мутаціями в гама-глобіновому промоторі підвищені.

30 [0040] На Фіг. 9 показана промоторна ділянка гама-глобінового гена (SEQ ID NO:149-152). Дві гама-глобінові алелі вирівняні (HBG1 і HBG2). Відмінності в послідовностях двох алелей позначені сірими боксами. Крім того, мутації, які зв'язані з СПФГ, вказані чорними контурами. Стартовий ATG вказується, як і межі екзону 1. Збільшення рівнів фетального глобіну, асоційованого з кожною мутацією, вказане числом над ним.

35 [0041] На Фіг. 10, панелі A і B, зображена кількість NHEJ (тобто, порушення наміченого локусу, що є наслідком відновлюючої події спрямованого нуклеазою розриву, що базується на NHEJ) і корекція гена, виявлена для бета-глобінового гена в клітинах CD34+ з використанням вказаної нуклеази "цинкові пальці" і олігонуклеотидних донорів.

40 [0042] На Фіг. 11 зображена кількість NHEJ і наміченої інтеграції донорського нуклеотиду в клітини CD34+, де гомологічні плечі на донорі різні.

45 [0043] На Фіг. 12 зображена стійкість генного редагування в еритроїдних похідних стовбурових клітин, які були оброблені ZFN і олігонуклеотидним донором. Генну модифікацію аналізували у чотирьох типів клітинних популяцій, що виникли внаслідок диференціювання, еритроїдних колонієутворюючих одиницях ("CFU-E"), еритроїдних бурстоутворюючих одиницях ("BFU-E"), колонієутворюючих одиницях гранулоцитів/макрофагів ("CFU-GM") і колонієутворюючих одиницях гранулоцитів/еритроцитів/моноцитів/макрофагів ("CFU-GEMM").

[0044] На Фіг. 13 зображена стабільність генної модифікації гена бета-глобіну в часі.

50 Детальний опис суті винаходу

[0045] В даному документі розкриті способи і композиції для вивчення і лікування генетичного захворювання, такого як гемоглобінопатія. Винахід описує геномне «редагування» клітини-мішені таким чином, що присутня сприятлива зміна експресії одного або більше глобінових генів, яка в свою чергу приводить до лікування гемоглобінопатій, таких як серпоподібно-клітинна хвороба або таласемія, у суб'єкта, який потребує цього. Сприятливі зміни експресії глобінового гена включають забезпечення гена γ-глобіну у суб'єкта з аберантним β-глобіном; та/або коригування послідовності аберантного гена α або β-глобіну, але не обмежуються ними. Крім того, доставка змінених гемопоетичних стовбурових клітин в трансплантат, змінений для експресії бажаного білкового продукту, може бути також корисною при лікуванні гемоглобінопатій, таких як серпоподібно-клітинна анемія або таласемія. Також

описані клітинні лінії і тварини із зміненою глобіновою експресією.

[0046] Таким чином, способи і композиції згідно винаходу можуть бути використані для зміни експресії одного або більше глобінових генів (наприклад, γ , α та/або β) в клітині (наприклад, еритроїдній клітині-попередниці). Ці способи і композиції можуть бути використані для руйнування генів, що беруть участь в γ -глобінній репресії (наприклад, BCL11A або KLF1), так що після редагування клітини будуть експресувати γ -глобін при більш високих рівнях і може бути одержаний HbF. Крім того, редагування може бути використано для руйнування сайту зв'язування на гені (наприклад, руйнування зв'язування BCL11A в бета-глобіновому локусі, руйнування зв'язування репресора транскрипції гама-глобіну в гама-глобіновому промоторі) для відключення репресії. Як альтернатива або в доповнення до цих змін, способи і композиції можуть бути використані для коригування аберантного α та/або β -глобінового гена або вставки гена дикого типу в задане місце локалізації в геномі клітини (наприклад, в HSC). Клітини-попередники можна отримати від потребуючих суб'єктів, модифікувати *ex vivo*, а потім повернути назад суб'єкту в трансплантаті кісткового мозку.

Загальне

[0047] Практика методів, а також одержання і застосування композицій, розкритих в даному документі, використовує, якщо не вказане інше, звичайні методи молекулярної біології, біохімії, хроматинової структури і аналізу, обчислювальної хімії, культури клітин, рекомбінантних ДНК і суміжних галузей, відомі фахівцям в даній галузі техніки. Ці методи повністю описані в літературі. Див., наприклад, Sambrook et al. MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, Second edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989 and Third edition, 2001; Ausubel et al., CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons, New York, 1987 і періодичні оновлення; серії METHODS IN ENZYMOLOGY, Academic Press, San Diego; Wolffe, CHROMATIN STRUCTURE AND FUNCTION, Third edition, Academic Press, San Diego, 1998; METHODS IN ENZYMOLOGY, Vol. 304, "Chromatin" (P.M. Wassarman and A. P. Wolffe, eds.), Academic Press, San Diego, 1999; і METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY, Vol. 119, "Chromatin Protocols" (P.B. Becker, ed.) Humana Press, Totowa, 1999.

Визначення

[0048] Терміни "нуклеїнова кислота", "полінуклеотид" і "олігонуклеотид" використовуються взаємозамінно і належать до дезоксирибонуклеотиду або рибонуклеотидного полімеру, лінійної або кільцевої конформації та одно- або дволанцюгової форми. Для цілей даного винаходу ці терміни не слід розглядати як обмежуючі відносно довжини полімеру. Терміни можуть включати відомі аналоги природних нуклеотидів, а також нуклеотидів, які змінюються в основному, у цукровому та/або фосфатному фрагментах (наприклад, в фосфоротіоатних скелетах). В цілому, аналог певного нуклеотиду має ту саму специфічність спарювання основ; тобто, аналог А буде утворювати пару з Т.

[0049] Терміни "поліпептид", "пептид" або "білок" використовуються взаємозамінно для позначення полімеру амінокислотних залишків. Термін також застосовується для амінокислотних полімерів, в яких одна або більше амінокислот є хімічними аналогами або модифікованими похідними відповідних амінокислот природного походження.

[0050] "Зв'язування" належить до специфічної відносно послідовності, нековалентної взаємодії між макромолекулами (наприклад, між білком і нуклеїновою кислотою). Не всі компоненти зв'язуючої взаємодії повинні бути специфічними відносно послідовності (наприклад, контакти з фосфатними залишками в скелеті ДНК), оскільки взаємодія в цілому є специфічною відносно послідовності. Такі взаємодії, як правило, характеризуються константою дисоціації (Kd) 10^{-6} M-1 або нижче. "Афінність" належить до сили зв'язування: підвищена афінність зв'язування корелює із зменшеною Kd.

[0051] "Зв'язуючий білок" являє собою білок, який здатен зв'язуватись нековалентно з іншою молекулою. Зв'язуючий білок може зв'язуватись, наприклад, з молекулою ДНК (ДНК-зв'язуючий білок), молекулою РНК (РНК-зв'язуючий білок) та/або білковою молекулою (білок-зв'язуючий білок). У випадку білок-зв'язуючого білка він може зв'язуватись сам із собою (утворюється гомодимер, гомотример і т.д.) та/або він може зв'язуватись з однією або більше молекулами іншого білка або білків. Зв'язуючий білок може мати більше ніж один тип зв'язуючої активності. Наприклад, білки «цинкові пальці» мають ДНК-зв'язуючу, РНК-зв'язуючу і білок-зв'язуючу активність.

[0052] "Білок, зв'язуючий ДНК цинкових пальців" (або зв'язуючий домен) є білком або доменом в межах більшого білка, який зв'язує ДНК способом, специфічним відносно послідовності, через один або більше цинкових пальців, які є ділянкою амінокислотної послідовності, в межах домену зв'язування якої структура стабілізується завдяки координації цинкового іону. Термін білок, зв'язуючий ДНК цинкових пальців, часто скорочують як білок

«цинкові пальці» або ZFP.

[0053] "TALE ДНК-зв'язуючий домен" або "TALE" є поліпептидом, що містить один або більше TALE повторних доменів/одиниць. Повторні домени беруть участь у зв'язуванні TALE з його когнантною ДНК-послідовністю-мішенню. Одна "повторна одиниця" (також називається

"повтором") зазвичай складає 33-35 амінокислот в довжину і демонструє, принаймні, однакову гомологію послідовності з іншими послідовностями TALE-повторів в межах білка TALE природного походження. Див., наприклад, патентну публікацію США № 20110301073.

[0054] Зв'язуючі домени «цинкових пальців» і TALE можуть бути "сконструйованими" для зв'язування визначеної нуклеотидної послідовності, наприклад, шляхом конструювання (змінюючи одну або більше амінокислот) спіральної ділянки розпізнавання білка «цинкові пальці» або TALE природного походження. Тому, сконструйовані ДНК-зв'язуючі білки («цинкові пальці» або TALE) являють собою білки, які не зустрічаються в природі. Необмежуваними прикладами способів конструювання ДНК-зв'язуючих білків є розробка і селекція. Розроблений ДНК-зв'язуючий білок являє собою білок, який не зустрічається в природі і чия конструкція/склад є наслідком, головним чином, раціонального критерію. Раціональний критерій для конструкції включає застосування правил заміщення і комп'ютерних алгоритмів для обробки інформації про існуючі конструкції ZFP та/або TALE і даних зв'язування. Див., наприклад, патенти США 6 140 081; 6 453 242 і 6 534 261; див. також WO 98/53058; WO 98/53059; WO 98/53060; WO 02/016536 і WO 03/016496 і патентну публікацію США 20110301073.

[0055] "Відібраний" білок «цинкові пальці» або TALE являє собою білок неприродного походження, продукування якого є наслідком, головним чином, емпіричного процесу, такого як фаговий дисплей, інтерактивна пастка або гібридна селекція. Див., наприклад, US 5 789 538; US 5 925 523; US 6 007 988; US 6 013 453; US 6 200 759; WO 95/19431; WO 96/06166; WO 98/53057; WO 98/54311; WO 00/27878; WO 01/60970 WO 01/88197; WO 02/099084 і патентну публікацію США 20110301073.

[0056] "Рекомбінація" належить до процесу обміну генетичною інформацією між двома полінуклеотидами. Для цілей цього опису, "гомологічна рекомбінація" (HR) належить до спеціалізованої форми такого обміну, який відбувається, наприклад, під час відновлення дволанцюгових розривів в клітині за допомогою гомологічно спрямованих відновних механізмів. Цей процес вимагає гомології нуклеотидних послідовностей, використання "донорської" молекули для відновлюючої матриці молекули-"мішені" (тобто, молекули, яка зазнала дволанцюгового розриву), і відомий як "некросинговерна конверсія генів" або "короткошляхова конверсія генів", так як він приводить до передачі генетичної інформації від донора до мішені. Не бажаючи бути пов'язаною з будь-якою конкретною теорією, така передача може включати коригування невідповідності гетеродуплексної ДНК, яка утворюється між розірваною мішенню і донором, та/або "синтез-залежний відпал нитки", в якому донор використовується для ресинтезу генетичної інформації, яка стане частиною мішені, та/або подібні процеси. Така спеціалізована HR часто приводить до зміни послідовності молекули-мішені таким чином, що частина або вся послідовність донорського полінуклеотиду включається в полінуклеотид-мішень.

[0057] В способах згідно даного розкриття, одна або більше нуклеаз-мішеней, як описано в даному документі, утворюють дволанцюговий розрив в послідовності-мішені (наприклад, клітинному хроматині) в заданому сайті, а "донорський" полінуклеотид, що має гомологію з нуклеотидною послідовністю в ділянці розриву, може бути введеним в клітину. Наявність дволанцюгового розриву, як було показано, полегшує інтеграцію донорської послідовності. Донорська послідовність може бути фізично інтегрована або, як альтернатива, донорський полінуклеотид використовується як матриця для відновлення розриву через гомологічну рекомбінацію, в результаті чого вводиться вся або частина нуклеотидної послідовності як донора в клітинний хроматин. Таким чином, перша послідовність в клітинному хроматині може змінюватись і, в деяких варіантах реалізації, може перетворюватись в послідовність, присутню в донорському полінуклеотиді. Таким чином, використання термінів "замінити" або "заміна" можна розуміти як репрезентування заміни однієї нуклеотидної послідовності іншою (тобто, заміна послідовності в інформаційному сенсі), і не обов'язково вимагає фізичної або хімічної заміни одного полінуклеотиду іншим.

[0058] В будь-якому з способів, описаних в даному документі, додаткові пари білків "цинкові пальці" або TALEN можуть бути використані для додаткового дволанцюгового розщеплення додаткових сайтів-мішеней в клітині. Крім того, система CRISPR/Cas може бути аналогічним чином використана для індукції додаткових дволанцюгових розривів.

[0059] В деяких варіантах реалізації способів спрямованої рекомбінації та/або заміни, та/або зміни послідовності в цільовій ділянці в клітинному хроматині, хромосомна послідовність

змінюється шляхом гомологічної рекомбінації з екзогенною "донорською" нуклеотидною послідовністю. Така гомологічна рекомбінація стимулюється наявністю дволанцюгового розриву в клітинному хроматині, якщо присутні послідовності, гомологічні ділянці розриву.

[0060] В будь-якому з способів, описаних в даному документі, екзогенна нуклеотидна послідовність ("донорська послідовність" або "трансген") може містити послідовності, які гомологічні, але не ідентичні, геномним послідовностям в цільовій ділянці, тим самим стимулюючи гомологічну рекомбінацію для вставки неідентичної послідовності в цільову ділянку. Таким чином, в деяких варіантах реалізації, ділянки послідовності донора, які гомологічні послідовності в цільовій ділянці та демонструють приблизно від 80 до 99 % (або будь-яке ціле значення між ними) ідентичності з геномною послідовністю, яка замінюється. В інших варіантах реалізації гомологія між донорською і геномною послідовністю становить вище, ніж 99 %, наприклад, якщо тільки один нуклеотид відрізняється між донорською і геномною послідовностями з більше ніж 100 суміжних пар основ. В деяких випадках, негомологічна частина донорської послідовності може містити послідовності, які відсутні в цільовій ділянці, так що нові послідовності вводяться в цільову ділянку. В цих випадках, негомологічна послідовність, як правило, фланкована послідовностями з 50-1000 пар основ (або будь-яке цілочисленне значення між ними) або будь-якої кількості пар основ, що перевищує 1000, які гомологічні або ідентичні послідовності в цільовій ділянці. В інших варіантах реалізації донорська послідовність, негомологічна першій послідовності, вставляється в геном шляхом механізмів негомологічної рекомбінації.

[0061] Будь-який з способів, описаних в даному документі, може бути використаний для часткової або повної інактивації однієї або більше послідовностей-мішеней в клітині шляхом спрямованої інтеграції донорської послідовності, яка порушує експресію гена(ів), що становить інтерес. Також передбачені клітинні лінії з частково або повністю інактивованими генами.

[0062] Крім того, способи спрямованої інтеграції, як описано в даному документі, також можуть бути використані для інтеграції однієї або декількох екзогенних послідовностей. Екзогенна послідовність нуклеїнової кислоти може містити, наприклад, один або більше генів або молекул кДНК або будь-який тип кодуєчої або некодуєчої послідовності, а також один або декілька елементів регуляції (наприклад, промотори). Крім того, екзогенна послідовність нуклеїнової кислоти може продукувати одну або декілька молекул РНК (наприклад, короткі шпилькові РНК (кшРНК), інгібуючі РНК (РНКіс), мікроРНК (міРНК) і т.д.).

[0063] "Розщеплення" належить до розриву ковалентного скелета молекули ДНК. Розщеплення може ініціюватись різними способами, включаючи ферментативний або хімічний гідроліз фосфодієфірного зв'язку, але не обмежуючись ними. Можливі як одноланцюгові розщеплення, так і дволанцюгові розщеплення, а дволанцюгові розщеплення можуть відбуватись в результаті двох різних подій одноланцюгових розщеплень. Розщеплення ДНК може привести до одержання тупих кінців або ступінчатих кінців. В деяких варіантах реалізації, злиті поліпептиди використовуються для адресного дволанцюгового розщеплення ДНК.

[0064] "Напівдомен розщеплення" являє собою поліпептидну послідовність, яка в сполученні з іншим поліпептидом (однаковим або відмінним) утворює комплекс, що має активність розщеплення (переважно дволанцюгову активність розщеплення). Терміни "перший і другий напівдомени розщеплення", "+ і - напівдомени розщеплення" і "правий і лівий напівдомени розщеплення" використовуються як взаємозамінні для позначення пар напівдоменів розщеплення, які димеризуються.

[0065] "Сконструйований напівдомен розщеплення" є напівдоменом розщеплення, модифікованим для того, щоб утворювати облігатні гетеродимери з іншим напівдоменом розщеплення (наприклад, з іншим сконструйованим напівдоменом розщеплення). Див., також патентні публікації США № 2005/0064474, 2007/0218528, 2008/0131962 і 2011/0201055, включені до даного документу шляхом посилання в повному обсязі.

[0066] Термін "послідовність" належить до нуклеотидної послідовності будь-якої довжини, яка може бути ДНК або РНК, може бути лінійною, кільцевою або розгалуженою і може бути одноланцюговою або дволанцюговою. Термін "донорська послідовність" належить до нуклеотидної послідовності, яка вставлена в геном. Донорська послідовність може бути будь-якої довжини, наприклад, від 2 до 10000 нуклеотидів в довжину (або будь-яким цілочисленним значенням між ними або вище), переважно від 100 до 1000 нуклеотидів в довжину (або будь-яким цілочисленним значенням між ними), більш переважно від приблизно 200 до 500 нуклеотидів в довжину.

[0067] "Патогенний ген" є геном, будь-яким чином ушкодженим при моногенному захворюванні. Необмежуючі приклади моногенних захворювань включають тяжкий комбінований імунodefіцит, кістозний фіброз, лізосомальні хвороби накопичення (наприклад,

хвороба Гоше, Херлера, Хантера, Фабрі, Неймана-Піка, Тай-Саха і т.д.), серпоподібно-клітинну анемію і таласемію.

[0068] "Хроматин" являє собою нуклеопротейнову структуру, що містить клітинний геном. Клітинний хроматин містить нуклеїнову кислоту, в першу чергу ДНК, і білок, включаючи гістони і негістонові хромосомні білки. Більшість еукаріотичного клітинного хроматину існує у вигляді нуклеосом, в яких нуклеосомне ядро містить приблизно 150 пар основ ДНК, зв'язаних з октамером, що містить два гістони H2A, H2B, H3 і H4; а лінкерна ДНК (перемінної довжини, в залежності від організму) простягається між нуклеосомними ядрами. Молекула гістону H1, як правило, зв'язана з лінкерною ДНК. Для цілей даного винаходу термін "хроматин" призначений охоплювати всі типи клітинного нуклеопротейну, як прокаріотичні, так і еукаріотичні. Клітинний хроматин включає як хромосомний, так і епісомний хроматин.

[0069] "Хромосома" являє собою хроматиновий комплекс, що включає весь або частину геному клітини. Геном клітини часто характеризується каріотипом, який являє собою сукупність всіх хромосом, що складають геном клітини. Геном клітини може містити одну або декілька хромосом.

[0070] "Епісома" є нуклеїноювою кислотою, що реплікується, нуклеопротейновим комплексом або іншою структурою, що містить нуклеїнову кислоту, яка не є частиною хромосомного каріотипу клітини. Приклади епісом включають плазміді і деякі вірусні геноми.

[0071] "Сайт-мішень" або "послідовність-мішень" являє собою послідовність нуклеїнової кислоти, яка визначає частину нуклеїнової кислоти, з якою зв'язуюча молекула буде зв'язуватись, і забезпечує умови, достатні для існування зв'язування.

[0072] "Екзогенна" молекула являє собою молекулу, яка зазвичай не зустрічається в клітині, але може бути введена в клітину за допомогою одного або декількох генетичних, біохімічних або інших методів. "Нормальна присутність в клітині" визначається відносно конкретної стадії розвитку і оточуючих умов клітини. Так, наприклад, молекула, яка присутня лише тільки під час ембріонального розвитку м'яза, є екзогенною молекулою відносно дорослої м'язової клітини. Аналогічно, молекула, індукована тепловим шоком, є екзогенною молекулою відносно клітини, що не піддавалась тепловому шоку. Екзогенна молекула може містити, наприклад, функціонуючу версію неправильно функціонуючої ендогенної молекули або неправильно функціонуючу версію нормально функціонуючої ендогенної молекули.

[0073] Екзогенна молекула може бути, зокрема, невеликою молекулою, наприклад, що генерується за допомогою процесу комбінаторної хімії, або макромолекулою, такою як білок, нуклеїнова кислота, вуглевод, ліпід, глікопротеїн, ліпопротеїн, полісахарид, будь-яке модифіковане похідне вищевказаних молекул або будь-який комплекс, що включає одну або більше вищевказаних молекул. Нуклеїнові кислоти включають ДНК і РНК, можуть бути одно- або дволанцюговими; можуть бути лінійними, розгалуженими або кільцевими; і можуть бути будь-якої довжини. Нуклеїнові кислоти включають кислоти, здатні утворювати дуплекси, а також триплексоутворюючі нуклеїнові кислоти. Див., наприклад, патенти США № 5176996 і 5422251. Білки включають ДНК-зв'язуючі білки, фактори транскрипції, фактори реконструкції хроматину, метильовані ДНК-зв'язуючі білки, метилази, деметилази, ацетилази, деацетилази, кінази, фосфатази, інтегрази, рекомбінази, лігази, топоізомерази, гірази і геліази, але не обмежуються ними.

[0074] Екзогенна молекула може бути молекулою того самого типу, що й ендогенна молекула, наприклад, екзогенним білком або нуклеїноювою кислотою. Наприклад, екзогенна нуклеїнова кислота може містити інфікуючий вірусний геном, плазміді або епісому, що вводяться в клітину, або хромосому, яка зазвичай є відсутньою в клітині. Способи введення екзогенних молекул в клітини відомі фахівцям в даній галузі і включають опосередкований ліпідами перенос (наприклад, ліпосоми, включаючи нейтральні і катіонні ліпіди), електропорацію, безпосередню ін'єкцію, злиття клітин, бомбардування частинками, фосфатно-кальцієве співосадження, DEAE-декстран-опосередкований перенос і опосередкований вірусним вектором перенос, але не обмежуються ними. Екзогенна молекула може також бути молекулою того самого типу, що й ендогенна молекула, але одержаною від іншого виду, ніж одержана клітина. Наприклад, послідовність нуклеїнової кислоти людини може бути введена в лінії клітин, спочатку одержані від мишей або хом'яка.

[0075] Навпаки, "ендогенна" молекула є молекулою, яка зазвичай наявна в певній клітині на певному етапі розвитку в конкретних умовах оточуючого середовища. Наприклад, ендогенна нуклеїнова кислота може містити хромосому, геном мітохондрії, хлоропласту або іншої органели, або бути епісомальною нуклеїноювою кислотою природного походження. Додаткові ендогенні молекули можуть включати білки, наприклад, фактори транскрипції і ферменти.

[0076] "Злита" молекула являє собою молекулу, в якій з'єднані дві або більше субодиничних

молекул, переважно, ковалентно. Молекулярні субодиноці можуть бути однакового хімічного типу, або можуть бути різними хімічними типами молекул. Приклади першого типу злитої молекули включають злиті білки (наприклад, злиття між ZFP або TALE ДНК-зв'язуючим доменом і одним або більше доменів активації) і злиті нуклеїнові кислоти (наприклад, нуклеїнову кислоту, що кодує злитий білок, описаний вище), але не обмежуються ними. Приклади іншого типу злитої молекули включають злиття між триплексоутворюючою нуклеїновою кислотою і поліпептидом і злиття між білком, що зв'язується з малою борозною, і нуклеїновою кислотою, але не обмежуються ними.

[0077] Експресія злитого білка в клітині може бути результатом доставки злитого білка в клітину або шляхом доставки полінуклеотиду, що кодує злитий білок, в клітину, де полінуклеотид транскрибується, а транскрипт транслюється для одержання злитого білка. Транс-сплайсинг, поліпептидне розщеплення і лігування поліпептиду можуть також брати участь в експресії білка в клітині. Методи полінуклеотидної і поліпептидної доставки в клітини надані в іншому розділі в цьому описі.

[0078] "Ген", для цілей даного винаходу включає ділянку ДНК, що кодує генний продукт (див. нижче), а також всі ділянки ДНК, які регулюють продукування генного продукту, незалежно від того, чи є такі регуляторні послідовності суміжними з кодуючою послідовністю та/або послідовністю, що транскрибується. Відповідно, ген включає, але не обов'язково обмежується ними, промоторні послідовності, термінатори, послідовності, що регулюють трансляцію, такі як сайти зв'язування рибосом і сайти внутрішньої посадки рибосом, енхансери, сайленсери, інсулятори, межові елементи, точки початку реплікації, сайти прикріплення матриці і локусні контрольні ділянки.

[0079] «Експресія гена» належить до перетворення інформації, що міститься в гені, в генний продукт. Генний продукт може бути прямим транскрипційним продуктом гена (наприклад, мРНК, тРНК, рРНК, антисмисловою РНК, рибозимом, структурною РНК або будь-яким іншим типом РНК) або білком, одержаним шляхом трансляції мРНК. Генні продукти також включають РНК, модифіковані за допомогою таких процесів, як кепування, поліаденілування, метилування і редагування, і білки, модифіковані, наприклад, метилуванням, ацетилюванням, фосфорилюванням, убіквітуванням, ADP-рибозилуванням, миристилюванням і глікозилюванням.

[0080] "Модуляція" експресії гена, належить до зміни активності гена. Модуляція експресії може включати активацію генів і репресію генів, але не обмежуватись ними. Редагування геному (наприклад, розщеплення, зміна, інактивація, випадкові мутації) може бути використана для модулювання експресії. Інактивація гена належить до будь-якого зниження експресії гена у порівнянні з клітиною, яка не включає ZFP або TALEN, як описано в даному документі. Таким чином, інактивація гена може бути частковою або повною.

[0081] "Цільова ділянка" являє собою будь-яку ділянку клітинного хроматину, таку як, наприклад, ген або некодуюча послідовність в межах або в безпосередній близькості до гена, в якій бажаним є зв'язування екзогенної молекули. Зв'язування може бути для цілей наміченого розщеплення ДНК та/або наміченої рекомбінації. Цільова ділянка може знаходитись в хромосомі, епісомі, органельному геномі (наприклад, мітохондрій, хлоропластів) або інфікуючому вірусному геномі, наприклад. Цільова ділянка може знаходитись в межах кодуючої ділянки гена, некодуючих ділянок, що транскрибуються, таких як, наприклад, лідерні послідовності, трейлерні послідовності або інтрони, або в межах ділянок, що не транскрибуються, upstream або downstream від кодуючої ділянки. Цільова ділянка може бути невеликою, як одна пара нуклеотидів або до 2000 пар нуклеотидів в довжину, або будь-яким цілочисленним значенням нуклеотидних пар.

[0082] "Еукаріотичні" клітини включають клітини грибів (наприклад, дріжджів), рослинні клітини, клітини тварин, клітини ссавців і клітини людини (наприклад, Т-клітини), але не обмежуються ними.

[0083] "Червоні кров'яні клітини" (ЧКК), або еритроцити, термінально диференційовані клітини, одержані з гемопоетичних стовбурових клітин. У них не має нуклеази і більшості клітинних органел. Еритроцити містять гемоглобін, щоб переносити кисень з легень до периферичних тканин. Насправді, 33 % індивідуальних ЧКК складає гемоглобін. Вони також переносять CO₂, що виробляється клітинами в процесі метаболізму, з тканин і назад в легені для вивільнення під час видиху. Еритроцити утворюються в кістковому мозку у відповідь на гіпоксію крові, яка опосередковується шляхом вивільнення еритропоетину (ЕРО) в нирках. ЕРО приводить до збільшення числа протоеритробластів і скорочує час, необхідний для повного дозрівання еритроцитів. Через приблизно 120 днів, оскільки ЧКК не містить ядра або будь-яких інших відновлюючих можливостей, клітини видаляють з обігу за допомогою фагоцитарної

активності макрофагів в печінці, селезінці та лімфатичних вузлах (~ 90%) або гемолізу в плазмі (~ 10%). Після поглинання макрофагами хімічні компоненти ЧКК руйнуються у вакуолях макрофагів під дією лізосомальних ферментів.

[0084] "Секреторні тканини" є тканинами тварин, які секретують продукти з окремої клітини в просвіт будь-якого типу, який зазвичай одержують з епітелію. Приклади секреторних тканини, локалізованих в шлунково-кишковому тракті, включають клітини, які вистилають кишечник, підшлункову залозу та жовчний міхур. Інші секреторні тканини включають печінку, тканини, зв'язані з оком та слизовими оболонками, такими як слинних залоз, молочних залоз, передміхурової залози, гіпофізу та інших членів ендокринної системи. Крім того, секреторні

тканини включають окремі клітини типу тканини, які здатні до секреції.
[0085] Терміни "функціональне з'єднання" і "функціонально зв'язаний" (або "функціонально з'єднаний") використовуються взаємозамінно з посиланням на співставлення двох або більше компонентів (наприклад, елементів послідовності), в яких компоненти розміщені таким чином, що обидва компоненти функціонують нормально і припускають можливість того, що, принаймні, один з компонентів може опосередковувати функцію, яка впливає, принаймні, на один з інших компонентів. Як ілюстрації, послідовність, що регулює транскрипцію, така як промотор, функціонально зв'язана з кодуючою послідовністю, якщо послідовність, що регулює транскрипцію, контролює рівень транскрипції кодуючої послідовності у відповідь на присутність або відсутність одного або більше регулюючих транскрипцію факторів. Регулююча транскрипцію послідовність зазвичай функціонально зв'язана in cis з кодуючою послідовністю, але необов'язково повинна бути в безпосередній близькості до неї. Наприклад, енхансер транскрипції є регуляторною послідовністю, яка функціонально зв'язана з кодуючою послідовністю, навіть якщо вони не є суміжними.

[0086] Що стосується злитих поліпептидів, то термін "функціонально зв'язаний" може стосуватись того, що кожний з компонентів виконує таку саму функцію в зв'язку з іншим компонентом так, якби вони не були зв'язані між собою. Наприклад, відносно злитого поліпептиду, в якому ZFP, TALE або Cas ДНК-зв'язуючий домен злитий з доменом активації, ZFP, TALE або Cas ДНК-зв'язуючий домен і домен активації зв'язані функціонально, якщо в злитому поліпептиді ZFP, TALE або Cas ДНК-зв'язуюча ділянка домену здатна зв'язувати сайт-мішень та/або його сайт зв'язування, в той час як домен активації може підвищувати експресію генів. Коли злитий поліпептид, в якому ZFP або TALE ДНК-зв'язуючий домен злитий з доменом розщеплення, ZFP або TALE ДНК-зв'язуючий домен і домен розщеплення зв'язані функціонально, якщо в злитому поліпептиді ZFP або TALE ДНК-зв'язуюча ділянка домену здатна зв'язувати сайт-мішень та/або його сайт зв'язування, а ділянку розщеплення може розщеплювати ДНК в безпосередній близькості від сайту-мішені.

[0087] "Функціональний фрагмент" білка, поліпептиду або нуклеїнової кислоти являє собою білок, поліпептид або нуклеїнову кислоту, послідовність яких не співпадає з непроцесованим білком, поліпептидом або нуклеїновою кислотою, але зберігає ті самі функції, що й у непроцесованого білка, поліпептиду або нуклеїнової кислоти. Функціональний фрагмент може мати більшу, меншу або таку ж кількість залишків, що й відповідна природна молекула, та/або може містити одну або більше амінокислотних або нуклеотидних замін. Методи визначення функції нуклеїнової кислоти (наприклад, кодуючу функцію, здатність до гібридизації з іншою нуклеїновою кислотою) добре відомі в даній галузі техніки. Аналогічно методи визначення функції білка добре відомі. Наприклад, ДНК-зв'язуюча функція поліпептиду може бути визначена, наприклад, за допомогою методу зв'язування на фільтрах, аналізу зміни електрофоретичної рухливості або імунопреципітації. Розщеплення ДНК може бути проаналізоване за допомогою гель-електрофорезу. Див. Ausubel і др., вище. Здатність білка взаємодіяти з іншим білком може бути визначена, наприклад, шляхом спільної імунопреципітації, двогібридних аналізів або комплементції, як генетичної, так і біохімічної. Див., наприклад, Fields et al. (1989) Nature 340:245-246; патент США № 5585245 і PCT WO 98/44350.

[0088] "Вектор" здатний переносити генні послідовності до клітин-мішеней. Як правило, "векторний конструкт", "вектор експресії" і "вектор переносу гена" означає будь-яку конструкцію нуклеїнової кислоти, здатну регулювати експресію цільового гена, і яка може переносити генні послідовності до клітин-мішеней. Таким чином, термін включає клонування і експресію носіїв, а також інтегруючих векторів.

[0089] "Ген-репортер" або "репортерна послідовність" належить до будь-якої послідовності, яка продукує білковий продукт, який легко виміряти, переважно, хоча і необов'язково, в звичайному аналізі. Придатні гени-репортери включають послідовності, що кодують білки, які опосередковують резистентність до антибіотику (наприклад, резистентність до ампіциліну,

резистентність до неоміцину, резистентність до G418, резистентність до пуроміцину), послідовності, що кодують забарвлені або флуоресцентні, або люмінесцентні білки (наприклад, зелений флуоресцентний білок, посилений зелений флуоресцентний білок, червоний флуоресцентний білок, люциферази), і білки, які опосередковують підвищений ріст клітин та/або ампліфікацію гена (наприклад, дигідрофолатредуктази), але не обмежуються ними. Епітопні мітки включають, наприклад, одну або більше копій FLAG, His, мус, Tap, HA або будь-яку виявлювану амінокислотну послідовність. "Експресійні мітки" включають послідовності, які кодують репортери, які можуть бути функціонально зв'язані з бажаною генною послідовністю, щоб контролювати експресію цільового гена.

[0090] Терміни "суб'єкт" і "пацієнт" використовуються взаємозамінно і належать до ссавців, таких як хворі люди і примати, що не належать до людського роду, а також до експериментальних тварин, таких як кролі, собаки, коти, щурі, миші та інші тварини. Відповідно, термін "суб'єкт" або "пацієнт", що використовується в контексті даного опису, означає будь-якого ссавця або суб'єкт, яким можуть бути введені змінні еритроцити (або стовбурові клітини) згідно даного винаходу. Суб'єкти згідно даного винаходу включають тих, хто зазнав впливу одного або більше хімічних токсинів, включаючи, наприклад, нейротоксин.

Нуклеази

[0091] В даному документі описані композиції, зокрема нуклеази, які є корисними для націлювання гена для використання при гемоглобінопатіях. В певних варіантах реалізації винаходу нуклеази мають природне походження. В інших варіантах реалізації нуклеази не є природними, тобто, є сконструйованими в ДНК-зв'язуючому домені та/або домені розщеплення. Наприклад, ДНК-зв'язуючий домен нуклеази природного походження може бути змінений з метою зв'язування вибраного сайту-мішені (наприклад, мегануклеаза, яка була змінена для зв'язування з сайтом, що відрізняється від когнантного сайту зв'язування). В інших варіантах реалізації, нуклеаза містить гетерологічні ДНК-зв'язуючі сайти і сайти розщеплення (наприклад, нуклеази «цинкові пальці»; TAL-ефекторні нуклеази; мегануклеазні ДНК-зв'язуючі домени з гетерологічними доменами розщеплення), або універсальна нуклеаза спрямовується специфічною гідовою РНК (наприклад, CRPISR/Cas).

А. ДНК-зв'язуючі домени

[0092] В певних варіантах реалізації винаходу нуклеазами є мегануклеази («хомінг»-ендонуклеаза). Мегануклеази природного походження розпізнають сайти розщеплення з 15-40 пар основ і зазвичай групуються в чотири сімейства: сімейство LAGLIDADG, сімейство GIY-YIG, боксове сімейство His-Cyst і сімейство HNH. Приклади «хомінг»-ендонуклеаз включають I-SceI, I-CeuI, PI-PspI, PI-Sce, I-SceIV, I-CsmI, I-PanI, I-SceII, I-PpoI, I-SceIII, I-CreI, I-TevI, I-TevII і I-TevIII. Їх послідовності розпізнавання відомі. Див. також патент США № 5 420032; патент США № 6833252; Belfort et al.(1997) *Nucleic Acids Res.*25:3379–3388; Dujon et al. (1989) *Gene*82:115–118; Perler et al.(1994) *Nucleic Acids Res.* 22, 1125–1127; Jasin (1996) *Trends Genet.*12:224–228; Gimble et al. (1996) *J. Mol. Biol.*263:163–180; Argast et al. (1998) *J. Mol. Biol.*280:345–353 і New England Biolabs catalogue.

[0093] В певних варіантах реалізації винаходу нуклеаза містить сконструйовану (не природного походження) «хомінг»-ендонуклеазу (мегануклеазу). Послідовності розпізнавання «хомінг»-ендонуклеаз і мегануклеаз, такі як I-SceI, I-CeuI, PI-PspI, PI-Sce, I-SceIV, I-CsmI, I-PanI, I-SceII, I-PpoI, I-SceIII, I-CreI, I-TevI, I-TevII і I-TevIII відомі. Див. також патент США № 5420032; патент США № 6833252; Belfort et al.(1997) *Nucleic Acids Res.*25:3379–3388; Dujon et al. (1989) *Gene*82:115–118; Perler et al.(1994) *Nucleic Acids Res.* 22, 1125–1127; Jasin (1996) *Trends Genet.*12:224–228; Gimble et al. (1996) *J. Mol. Biol.*263:163–180; Argast et al. (1998) *J. Mol. Biol.*280:345–353 і New England Biolabs catalogue. Крім того, ДНК-зв'язуюча специфічність «хомінг»-ендонуклеаз і мегануклеаз може бути сконструйована таким чином, щоб зв'язувати штучні сайти-мішені. Див., наприклад, Chevalier et al. (2002) *Molec. Cell* 10:895-905; Epinat et al.(2003) *Nucleic Acids Res.* 31:2952-2962; Ashworth et al. (2006) *Nature*441:656-659; Paques et al. (2007) *Current Gene Therapy* 7:49-66; патентну публікацію США № 20070117128. ДНК-зв'язуючі домени «хомінг»-ендонуклеаз і мегануклеаз можуть змінюватись в контексті нуклеаз в цілому (тобто, так що нуклеаза містить когнантний сайт розщеплення) або може бути злиною з гетерологічним доменом розщеплення.

[0094] В інших варіантах реалізації винаходу ДНК-зв'язуючий домен містить природний або сконструйований (не природного походження) TAL ефекторний ДНК-зв'язуючий домен. Див., наприклад, патентну публікацію № 20110301073, включену до даного документу шляхом посилання у повному обсязі. Фітопатогенні бактерії роду *Xanthomonas*, як відомо, спричиняють багато хвороб у важливих сільськогосподарських культур. Патогенність *Xanthomonas* залежить від консервативного типу III секреторної (T3S) системи, яка ін'єктує більше ніж 25 різних

ефекторних білків в рослинну клітину. Серед цих ін'єктованих білків знаходяться транскрипційні активатор-подібні ефектори (TALE), які імітують рослинні активатори транскрипції і маніпулюють рослинними транскриптами (див. Kay et al (2007) Science 318:648-651). Ці білки містять ДНК-зв'язуючий домен і домен активації транскрипції. Одним з найбільш добре охарактеризованих TALE є AvrBs3 з *Xanthomonas campestris* патовар *Vesicatoria* (див. Bonas et al (1989) Mol Gen Genet 218: 127-136 і WO2010079430). TALE містить централізований домен тандемних повторів, кожний повтор містить приблизно 34 амінокислоти, які є ключем до ДНК-зв'язуючої специфічності цих білків. Крім того, вони містять нуклеарно локалізаційну послідовність і кислотний домен активації транскрипції (для огляду див. SchoPHKck S, et al (2006) J Plant Physiol 163(3): 256-272). Крім того, у фітопатогенної бактерії *Ralstonia solanacearum*, як було виявлено, два гени, позначені *brg11* і *hpx17*, є гомологічними до сімейства AvrBs3 з *Xanthomonas* у штаму GMI1000 біовару 1 *R. solanacearum* і у штаму RS1000 біовару 4 (див. Heuer et al (2007) Appl and Envir Micro 73(13): 4379-4384). Ці гени на 98,9 % ідентичні один одному в нуклеотидній послідовності, але відрізняються делецією 1575 п.о. в домені повтору *hpx17*. Однак, обидва генні продукти мають менш ніж 40 % ідентичність послідовностей з білками сімейства AvrBs3 з *Xanthomonas*.

[0095] Таким чином, в деяких варіантах реалізації винаходу ДНК-зв'язуючий домен, який зв'язує сайт-мішень в локусі-мішені (наприклад, глобіновому або «затишної гавані») є сконструйованим доменом з TAL-ефектора, подібного до тих, що одержані від патогенів *Xanthomonas* (див. Boch et al, (2009) Science 326: 1509-1512 і Moscou and Bogdanove, (2009) Science 326: 1501) і *Ralstonia* (див. Heuer et al (2007) Applied and Environmental Microbiology 73(13): 4379-4384); патент США № 8420782 і 8440431 і патентну публікацію США 20110301073.

[0096] В певних варіантах реалізації винаходу ДНК-зв'язуючий домен містить білок «цинкові пальці» (наприклад, білок «цинкові пальці», який зв'язує сайт-мішень в глобіновому гені або гені «затишної гавані»). Переважно, білок «цинкові пальці» не має природного походження, він сконструйований, щоб зв'язувати кращий сайт-мішень. Див., наприклад, Beerli et al. (2002) Nature Biotechnol. 20:135-141; Pabo et al. (2001) Ann. Rev. Biochem. 70:313-340; Isalan et al. (2001) Nature Biotechnol. 19:656-660; Segal et al. (2001) Curr. Opin. Biotechnol. 12:632-637; Choo et al. (2000) Curr. Opin. Struct. Biol. 10:411-416, патенти США № 6453242; 6534261; 6599692; 6503717; 6689558; 7030215; 6794136; 7067317; 7262054; 7070934; 7361635; 7253273; і патентні публікації США № 2005/0064474; 2007/0218528; 2005/0267061, всі включені до даного документу шляхом посилання у повному обсязі.

[0097] Сконструйоване зв'язування «цинкових пальців» або домен TALE може мати нову специфічність зв'язування у порівнянні з природним білком «цинкові пальці». Методи конструювання включають конструктивну розробку і різні типи відбору, але не обмежуються ними. Конструктивна розробка включає, наприклад, використання баз даних, що містять триплетні (або квадруплетні) нуклеотидні послідовності та індивідуальні амінокислотні послідовності «цинкових пальців», в яких кожна триплетна або квадруплетна нуклеотидна послідовність асоціюється з однією або більше амінокислотними послідовностями «цинкових пальців», які зв'язують окрему триплетну або квадруплетну послідовність. Див., наприклад, патенти США 6 453 242 і 6 534 261, включені до даного документу шляхом посилання в повному обсязі.

[0098] Приклади методів відбору, включаючи фаговий дисплей і двогибридні системи, розкриті в патентах США 5 789 538; 5 925 523; 6 007 988; 6 013 453; 6 410 248; 6 140 466; 6 200 759 і 6,242,568; а також WO 98/37186; WO 98/53057; WO 00/27878; WO 01/88197 і GB 2,338,237. Крім того, покращення специфічності зв'язування доменів зв'язування «цинкових пальців» описані, наприклад, в WO 02/077227.

[0099] Крім того, як розкрито в даному документі та інших посиланнях, ДНК-домени (наприклад, мультипальцевий білок «цинкові пальці» або домени TALE) можуть об'єднуватись разом з використанням будь-якої придатної лінкерної послідовності, включаючи, наприклад, лінкери з 5 або більше амінокислот в довжину. Див., також патенти США № 6479626; 6903185 і 7153949 стосовно лінкерних послідовностей з 6 або більше амінокислот в довжину. ДНК-зв'язуючі білки, описані в даному документі, можуть включати будь-яку комбінацію придатних лінкерів між окремими «цинковими пальцями» білка. Крім того, покращення специфічності зв'язування доменів зв'язування «цинкових пальців» описані, наприклад, в WO 02/077227.

[0100] Відбір сайтів-мішеней; ДНК-зв'язуючих доменів і способів для розробки і конструювання злитих білків (і полінуклеотидів, що їх кодують) відомі фахівцям в цій галузі техніки і докладно описані в патентах США № 61400815; 789538; 6453242; 6534261; 5925523; 6007988; 6013453; 6200759; WO 95/19431; WO 96/06166; WO 98/53057; WO 98/54311; WO 00/27878; WO 01/60970 WO 01/88197; WO 02/099084; WO 98/53058; WO 98/53059; WO 98/53060;

WO 02/016536 і WO 03/016496 і патентній публікації США № 20110301073.

[0101] Крім того, як розкрито в даному документі та інших посиланнях, ДНК-зв'язуючі домени (наприклад, мультипальцевий білок «цинкові пальці») можуть об'єднуватись разом з використанням будь-якої придатної лінкерної послідовності, включаючи, наприклад, лінкери з 5 амінокислот в довжину. Див. також патенти США № 6479626; 6903185; і 7153949 стосовно прикладів лінкерних послідовностей з 6 або більше амінокислот в довжину. Білки, описані в даному документі, можуть включати будь-яку комбінацію придатних лінкерів між окремими «цинковими пальцями» білка.

В. Домени розщеплення

[0102] Будь-який придатний домен розщеплення може функціонально з'єднуватись з ДНК-зв'язуючим доменом для утворення нуклеази. Наприклад, ZFP ДНК-зв'язуючі домени зливаються з нуклеазними доменами для створення ZFN – функціональної одиниці, яка здатна розпізнати свою намічену нуклеїнову кислоту-мішень за допомогою свого сконструйованого (ZFP) ДНК-зв'язуючого домену і обумовлює ДНК, що підлягає розрізанню біля сайту зв'язування ZFP за допомогою нуклеазної активності. Див., наприклад, Kim et al. (1996) *Proc Nat'l Acad Sci USA* 93(3):1156-1160. Нещодавно, ZFN були використані для модифікації геному в різних організмах. Див., наприклад, патентні публікації США 20030232410; 20050208489; 20050026157; 20050064474; 20060188987; 20060063231; і міжнародну публікацію WO 07/014275. Аналогічно, TALE ДНК-зв'язуючі домени зливаються з нуклеазними доменами для створення TALEN. Див., наприклад, патентну публікацію США № 20110301073.

[0103] Як відмічалось вище, домен розщеплення може бути гетерологічним відносно ДНК-зв'язуючого домену, наприклад, ДНК-зв'язуючий домен «цинкових пальців» і домен розщеплення з нуклеази або TALEN ДНК-зв'язуючий домен і домен розщеплення, або мегануклеазний ДНК-зв'язуючий домен і домен розщеплення від різних нуклеаз. Гетерологічні домени розщеплення можуть бути одержані від будь-якої ендонуклеази або екзонуклеази. Приклади ендонуклеаз, від яких можуть бути одержані домени розщеплення, включають рестрикційні ендонуклеази і «хомінг»-ендонуклеази, але не обмежуються ними. Див., наприклад, 2002-2003 Catalogue, New England Biolabs, Beverly, MA; і Belfort et al. (1997) *Nucleic Acids Res.* 25:3379-3388. Відомі додаткові ферменти, які розщеплюють ДНК (наприклад, нуклеаза S1; маш-нуклеаза; панкреатична ДНКаза I; мікрокова нуклеаза; дріжджова НО ендонуклеаза; див. також Linn et al. (eds.) *Nucleases*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1993). Один або більше з цих ферментів (або їх функціональних фрагментів) можуть бути використані як джерело доменів розщеплення і напівдоменів розщеплення.

[0104] Аналогічно, напівдомен розщеплення може бути одержаний від будь-якої нуклеази або її частини, як вказано вище, що потребує димеризації для розщеплюючої активності. Зазвичай, для розщеплення цільово два злитих білки, якщо злиті білки містять напівдомени розщеплення. Як альтернатива, може бути використаний одиничний білок, що містить два напівдомени розщеплення. Два напівдомени розщеплення можуть бути одержані від однієї ендонуклеази (або її функціональних фрагментів), або кожний напівдомен розщеплення може бути одержаний від різних ендонуклеаз (або їх функціональних фрагментів). Крім того, сайти-мішені для двох злитих білків переважно розміщені відносно один одного таким чином, щоб зв'язування двох злитих білків в їх відповідних сайтах-мішенях розташовувало напівдомени розщеплення в просторовій орієнтації один до одного, що дозволяє напівдоменам розщеплення утворювати функціональний домен розщеплення, наприклад, шляхом димеризації. Таким чином, в певних варіантах реалізації винаходу ближні краї сайтів-мішеней розділені 5-8 нуклеотидами або 15-18 нуклеотидами. Однак, будь-яке ціле число нуклеотидів або нуклеотидних пар може лежати між двома сайтами-мішенями (наприклад, від 2 до 50 пар нуклеотидів і більше). В цілому, сайт розщеплення знаходиться між сайтами-мішенями.

[0105] Рестрикційні ендонуклеази (рестрикційні ферменти) присутні у багатьох видів і здатні специфічно зв'язуватись з послідовністю ДНК (в сайті розпізнавання), і розщеплювати ДНК в або поблизу сайту зв'язування. Деякі рестрикційні ферменти (наприклад, Тип IIS) розщеплюють ДНК на сайтах, віддалених від сайту розпізнавання і мають розділені домени зв'язування і розщеплення. Наприклад, тип IIS ферменту Fok I каталізує дволанцюгові розщеплення ДНК, з 9 нуклеотидів з її сайту розпізнавання на одному ланцюзі та 13 нуклеотидів з її сайту розпізнавання на іншому. Див., наприклад, патенти США 5 356 802; 5 436 150 і 5 487 994; а також Li et al. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:4275-4279; Li et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:2764-2768; Kim et al. (1994a) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:883-887; Kim et al. (1994b) *J. Biol. Chem.* 269:31,978-31,982. Таким чином, в одному варіанті реалізації винаходу злиті білки містять домен розщеплення (або напівдомен розщеплення), принаймні, від одного типу IIS рестрикційного ферменту і один або більше доменів зв'язування «цинкових пальців», які можуть

бути сконструйованими або несконструйованими.

[0106] Прикладом рестрикційного ферменту типу IIS, чий домен розщеплення віддалений від зв'язуючого домену, є Fok I. Цей конкретний фермент активний як димер. Bitinaite et al. (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 10,570-10,575. Відповідно, для цілей даного опису винаходу частина ферменту Fok I, що використовується в розкритих злитих білках, вважається напівдоменом розщеплення. Таким чином, для спрямованого дволанцюгового розщеплення та/або цілеспрямованої заміни клітинних послідовностей з використанням злиттів "цинковий палець"-Fok I, два злитих білки, кожний з яких містить напівдомен розщеплення Fok I, можуть бути використані для відновлення каталітично активного домену розщеплення. Як альтернатива, також може бути використана одна молекула поліпептиду, що містить ДНК-зв'язуючий домен і два напівдомени розщеплення Fok I.

[0107] Домен розщеплення або напівдомен розщеплення може бути будь-якою частиною білка, яка зберігає активність розщеплення або зберігає здатність до мультимеризації (наприклад, димеризації) з утворенням функціонального домену розщеплення.

[0108] Приклади рестрикційних ферментів типу IIS описані в міжнародній публікації WO 07/014275, включений до даного опису шляхом посилання в повному обсязі. Додаткові ферменти рестрикції також містять розділені домени зв'язування і розщеплення, і вони розглядаються в даному описі винаходу. Див., наприклад, Roberts et al. (2003) Nucleic Acids Res. 31:418-420.

[0109] В певних варіантах реалізації винаходу домен розщеплення містить один або більше сконструйованих напівдомених розщеплення (також згадуються як мутантні домени димеризації), які мінімізують або попереджують гомодимеризацію, як описано, наприклад, в патентних публікаціях № 20050064474; 20060188987 і 20080131962, їх описи включені шляхом посилання до даного документу у повному обсязі. Амінокислотні залишки в положеннях 446, 447, 479, 483, 484, 486, 487, 490, 491, 496, 498, 499, 500, 531, 534, 537 і 538 в Fok I всі є мішенями для впливу димеризації напівдомених розщеплення Fok I.

[0110] Приклади сконструйованих напівдомених розщеплення Fok I, які утворюють облігатні гетеродимери, включають пару, в якій перший напівдомен розщеплення включає мутації амінокислотних залишків в положеннях 490 і 538 Fok I, а другий напівдомен розщеплення включає мутації амінокислотних залишків 486 і 499.

[0111] Таким чином, в одному варіанті реалізації винаходу мутація в 490 замінює Glu (E) лізином (K); мутація в 538 замінює Iso (I) Lys (K); мутація в 486 замінює Gln (Q) Glu (E); а мутація в положенні 499 замінює Iso (I) Lys (K). Зокрема, сконструйовані напівдомени розщеплення, описані в даному документі, були одержані шляхом мутації в положеннях 490 (E → K) і 538 (I → K) в одному напівдоміні розщеплення для одержання сконструйованого напівдомену розщеплення, позначеного "E490K: I538K", і мутацій в положеннях 486 (Q → E) і 499 (I → L) в другому напівдоміні розщеплення для одержання сконструйованого напівдомену розщеплення, позначеного "Q486E: I499L". Сконструйовані напівдомени розщеплення, описані в даному документі, є облігатними гетеродимерними мутантами, в яких аберантне розщеплення мінімізоване або скасоване. Див., наприклад, патентну публікацію США № 2008/0131962, розкриття якої включене до даного документу як посилання в повному обсязі для всіх цілей.

[0112] В певних варіантах реалізації винаходу сконструйований напівдомен розщеплення містить мутації в положеннях 486, 499 і 496 (пронумеровані відносно FokI дикого типу), наприклад, мутації, які заміщують залишок Gln (Q) дикого типу в положенні 486 залишком Glu (E), залишок Iso (I) дикого типу в положенні 499 залишком лейцину (L) і залишок Asn (N) дикого типу в положенні 496 залишком Asp (D) або Glu (E) (також згадуються як домени "ELD" і "ELE", відповідно). В інших варіантах реалізації винаходу сконструйований напівдомен розщеплення містить мутації в положеннях 490, 538 і 537 (пронумеровані відносно FokI дикого типу), наприклад, мутації, які заміщують залишок Glu (E) дикого типу в положенні 490 залишком Lys (K), залишок Iso (I) дикого типу в положенні 538 залишком Lys (K) і залишок His (H) дикого типу в положенні 537 залишком Lys (K) або залишком Arg (R) (також згадуються як домени "KKK" і "KKR", відповідно). В інших варіантах реалізації винаходу сконструйований напівдомен розщеплення містить мутації в положеннях 490 і 537 (пронумеровані відносно FokI дикого типу), наприклад, мутації, які заміщують залишок Glu (E) дикого типу в положенні 490 залишком Lys (K), залишок His (H) дикого типу в положенні 537 залишком Lys (K) або залишком Arg (R) (також згадуються як домени "KIK" і "KIR", відповідно). (Див. патентну публікацію США № 20110201055, включену в даний документ шляхом посилання). Сконструйовані напівдомени розщеплення, описані в даному документі, можуть бути одержані з використанням будь-якого придатного методу, наприклад, за допомогою сайт-спрямованого мутагенезу напівдомених розщеплення дикого типу (Fok I), як описано в патентних публікаціях № 20050064474; 20080131962 і

20110201055.

[0113] Як альтернатива, нуклеази можуть бути зібрані *in vivo* в сайті-мішені нуклеїнової кислоти з використанням так званої технології "розщеплення-фермент" (див., наприклад, патентну публікацію США № 20090068164). Компоненти таких розщеплюючих ферментів можуть експресуватись або в окремих експресійних конструктах, або можуть об'єднуватись в одній відкритій рамці зчитування, в якій індивідуальні компоненти розділені, наприклад, саморозщеплюваним білком 2A або послідовністю IRES. Компоненти можуть бути індивідуальними доменами зв'язування «цинкових пальців» або доменами зв'язуючого домену нуклеїнової кислоти мегануклеази.

[0114] Нуклеази можуть піддаватись скринінгу на активність перед застосуванням, наприклад, в дріжджовій хромосомній системі, як описано у WO 2009/042163 і 20090068164. Конструкти експресії нуклеаз можна легко розробити з використанням способів, відомих в даній галузі техніки. Див., наприклад, патентні публікації США 20030232410; 20050208489; 20050026157; 20050064474; 20060188987; 20060063231 і міжнародну публікацію WO 07/014275. Експресія нуклеази може знаходитись під контролем конститутивного промотору або індукцибельного промотору, наприклад промотору галактокінази, який активується (дерепресується) в присутності рафінози та/або галактози і пригнічується в присутності глюкози.

Система CRISPR/Cas

[0115] Останнім часом з'явилися переконливі докази на користь існування РНК-опосередкованого геному захисного шляху у архей та багатьох бактерій, гіпотеза про який була висунута паралельно до еукаріотичного шляху РНКі (для огляду див. Godde and Bickerton, 2006. *J. Mol. Evol.* 62: 718-729; Lillestol et al., 2006. *Archaea* 2: 59-72; Makarova et al., 2006. *Biol. Direct* 1: 7.; Sorek et al., 2008. *Nat. Rev. Microbiol.* 6: 181-186). Відомий як система CRISPR-CAS або прокаріотична РНКі (пРНКі), шлях, як передбачається, виник з двох еволюційно і часто фізично зв'язаних генних локусів: локусу CRISPR (кластерних коротких поліндормних повторів, розділених регулярними проміжками), який кодує РНК-компоненти системи, і локусу CAS (CRISPR-асоційованого), який кодує білки (Jansen et al., 2002. *Mol. Microbiol.* 43: 1565-1575; Makarova et al., 2002. *Nucleic Acids Res.* 30: 482-496; Makarova et al., 2006. *Biol. Direct* 1: 7; Haft et al., 2005. *PLoS Comput. Biol.* 1: e60). Локуси CRISPR в мікробних хазяях містять комбінацію CRISPR-асоційованих (Cas) генів, а також некодуючі РНК-елементи, здатні програмувати специфічність CRISPR-опосередкованого розщеплення нуклеїнових кислот. Індивідуальні білки Cas не поділяють значної схожості з білковими компонентами еукаріотичного РНКі комплексу, але мають аналогічні передбачені функції (наприклад, РНК-зв'язування, нуклеазу, хеліказу і т. п.) (Makarova et al., 2006. *Biol. Direct* 1: 7). CRISPR-асоційовані (cas) гени часто зв'язані з наборами CRISPR повтор-спейсер. Описано більше ніж сорок різних Cas-білкових сімейств. В цих білкових сімействах, Cas1, як уявляється, є убіквітарним серед різних систем CRISPR/Cas. Окремі комбінації генів cas і структур повторів використовуються для визначення 8 підтипів CRISPR (*E. coli*, *Y. pestis*, *N. meningitidis*, *D. vulgaris*, *T. neapolitanus*, *H. maris*, *A. pernix* і *M. tuberculosis*), деякі з них асоціюються з додатковим генним модулем, кодуючим повтор-асоційовані загадкові білки (RAMP). В одному геномі може знаходитись більше ніж один підтип CRISPR. Спорадичний розподіл підтипів CRISPR/Cas показує, що система є предметом для горизонтального генного переносу під час мікробіологічної еволюції.

[0116] Тип II CRISPR (представлений Cas9) є однією з найбільш добре охарактеризованих систем і здійснює цілеспрямований дволанцюговий розрив ДНК в чотири послідовних етапи. Перший, дві некодуючі РНК, набір пре-crРНК і tracrРНК, транскрибуються з локусу CRISPR. Другий, tracrРНК гібридує з повторними ділянками пре-crРНК і опосередковує процесинг пре-crРНК в зрілі crРНК, що містять індивідуальні спейсерні послідовності. Третій, комплекс зріла crРНК:tracrРНК спрямовує Cas9 до ДНК-мішені шляхом спарювання, виходячи з правила Уотсона-Кріка, між спейсером на crРНК і протоспейсером на ДНК-мішені поряд з протоспейсерним суміжним мотивом (PAM), додаткова вимога для розпізнавання мішені. На завершення, Cas9 опосередковує розщеплення ДНК-мішені для створення дволанцюгового розриву в межах протоспейсеру. Активність системи CRISPR/Cas включає три етапи: (i) вставка чужих ДНК-послідовностей в набір CRISPR для попередження майбутніх атак в процесі, названому «адаптація», (ii) експресія релевантних білків, а також експресія і процесинг набору, за яким слідує (iii) РНК-опосередкована інтерференція з чужою нуклеїновою кислотою. Таким чином, в бактеріальній клітині декілька так званих «Cas» білків є зв'язаними з природною функцією системи CRISPR/Cas.

[0117] Первинні продукти локусів CRISPR, як уявляється, є короткими РНК, які містять упорядковані цілеспрямовані послідовності, і названі гідовими РНК або прокаріотичними сайленсинговими РНК (psiРНК), виходячи з їх гіпотетичної ролі в метаболічному шляху

(Makarova et al.(2006) Biol. Direct 1:7; Hale et al.(2008) PNH14: 2572-2579). Аналіз PNH вказує, що локусні транскрипти CRISPR розщеплюються в межах послідовностей повторів з вивільненням від 60- до 70-нітронних проміжних PNH-сполук, які містять індивідуальні захоплюючі цілеспрямовані послідовності та фланкуючі фрагменти повторів (Tang et al. (2002) Proc. Natl. Acad. Sci. 99: 7536-7541; Tang et al. (2005) Mol. Microbiol. 55:469-481; Lillestol et al. (2006) Archaea 2:59-72; Brouns et al. (2008) Science 321: 960-964; Hale et al. (2008) PNH 14:2572-2579). У архаїчної *Pyrococcus furiosus*, ці проміжні PNH додатково процесуються до розповсюджених, стабільних 35–45-нітронних зрілих psiPNH (Hale et al. (2008)PNH14: 2572-2579).

Білки Cas

[0118] Поліпептид "Cas1" належить до CRISPR асоційованого (Cas) білка 1. Cas1 (COG1518 в кластерах ортологічної групи системи класифікації білків), є кращим маркером CRISPR-асоційованих систем (CASS). Виходячи з філогенетичних порівнянь, ідентифіковано сім окремих версій CRISPR-асоційованої імунної системи (CASS1-7).

[0119] Поліпептидом Cas1, що застосовується в способах, описаних в даному документі, може бути будь-який поліпептид Cas1, присутній в будь-якому прокариоті. В певних варіантах реалізації винаходу поліпептидом Cas1 є поліпептид Cas1 архаїчного мікроорганізму. В певних варіантах реалізації винаходу поліпептидом Cas1 є поліпептид Cas1 мікроорганізму Euryarchaeota. В певних варіантах реалізації винаходу поліпептидом Cas1 є поліпептид Cas1 мікроорганізму Crenarchaeota. В певних варіантах реалізації винаходу поліпептидом Cas1 є поліпептид Cas1 бактерії. В певних варіантах реалізації винаходу поліпептидом Cas1 є поліпептид Cas1 грам-негативної або грам-позитивної бактерії. В певних варіантах реалізації винаходу поліпептидом Cas1 є поліпептид Cas1 *Pseudomonas aeruginosa*. В певних варіантах реалізації винаходу поліпептидом Cas1 є поліпептид Cas1 *Aquifexaerolicus*. В певних варіантах реалізації винаходу поліпептидом Cas1 є поліпептид Cas1, який є членом одного з CASS1-7. В певних варіантах реалізації винаходу поліпептидом Cas1 є поліпептид Cas1, який є членом CASS3. В певних варіантах реалізації винаходу поліпептидом Cas1 є поліпептид Cas1, який є членом CASS7. В певних варіантах реалізації винаходу поліпептидом Cas1 є поліпептид Cas1, який є членом CASS3 або CASS7.

[0120] В деяких варіантах реалізації винаходу поліпептид Cas1 кодується нуклеотидною послідовністю, забезпеченою GenBank, наприклад, під номером GeneID: 2781520, 1006874, 9001811, 947228, 3169280, 2650014, 1175302, 3993120, 4380485, 906625, 3165126, 905808, 1454460, 1445886, 1485099, 4274010, 888506, 3169526, 997745, 897836 або 1193018, та/або представлений амінокислотною послідовністю, що демонструє гомологію (наприклад, більше ніж 80 %, від 90 до 99 %, включаючи 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % або 99 %) з амінокислотною послідовністю, що кодується цими поліпептидами і чиї поліпептиди функціонують як поліпептиди Cas1.

[0121] Cas6 є другим поліпептидом Cas, а ендорибонуклеазна активність належить в цьому документі до ендорибонуклеазної активності Cas6. Необмежуючі приклади придатних поліпептидів вказані в Genbank під номером доступу AAL81255. Поліпептид Cas6 може бути збагаченим, виділеним або очищеним від мікробу, що має локус CRISPR і локус cas (CRISPR-асоційований), такого як *Pyrococcus furiosus*, але не обмежується ним, або може бути одержаний з використанням рекомбінантних технологій, або бути хімічно або ферментативно синтезованим з використанням шаблонних методів. В деяких аспектах, поліпептид Cas6 може бути збагаченим, виділеним або очищеним від мікробу, який не має локусів CRISPR. Поліпептид Cas6 містить, принаймні, один залишок, який може відігравати роль в каталізі, або його консервативне заміщення. Поліпептид Cas6 може містити інші залишки, які також можуть відігравати роль в каталізі, або їх консервативні заміщення. Очікується, що залишок(и), що відіграють роль в каталізі, можуть розташовуватись біля G-багатої петлі, яка містить розпізнавальний мотив Cas6 в 3D структурі білка. Поліпептиди Cas6 можуть містити домени, присутні в базі даних TIGRFAM під номерами доступу TIGR01877 і PF01881. База даних TIGRFAM містить сімейства поліпептидів, функція яких зберігається (Haft et al. (2003) Nucl. Acids Res. 31:371-373, Bateman and Haft (2002) Briefings Bioinformatics, 3:236-245, і Haft et al. (2005) PLoS Computational Biol. 1(6):e60).

[0122] Інші приклади поліпептидів Cas6, передбачені даним документом, включають поліпептиди, присутні в прокариотичних мікробах, що мають локус CRISPR і локус cas. Поліпептиди Cas6 можна легко ідентифікувати в будь-якому мікробі, який містить локус CRISPR. Кодуюча ділянка, яка кодує поліпептид Cas6, як правило, знаходиться в локусі cas, розташованому в безпосередній близькості до локусу CRISPR. Haft et al. (2005) PLoS Computational Biol. 1(6):e60) зробив огляд сімейства білків Cas і створив правила ідентифікації специфічних підтипів системи CRISPR/Cas. Haft et al. описав кодуєчу ділянку, яка кодує

поліпептиди Cas6, як виявлено в зв'язку, принаймні, з чотирма окремими підтипами CRISPR/Cas (Tneap, Hmari, Aperi i Mtube), і як правило є cas-кодуючою ділянкою, розташованою якнайдалі від локусу CRISPR. Поліпептиди Cas6 можна ідентифікувати, використовуючи ресурси, доступні від JCVI Comprehensive Microbial Resource. Таким чином, поліпептиди Cas6, які корисні в способах, описаних в даному документі, можуть бути ідентифіковані фахівцем в даній галузі з використанням рутинних методів.

[0123] Приклади прокаріотичних мікробів з відомими цілими геномними послідовностями, що містять кодуючі ділянки, що, як очікується, кодують поліпептид Cas6, включають *Thermotogamaritima* MSB8, *Campylobacter fetus* підвид *fetus* 82-40, *Fusobacteriumnucleatum* ATCC 25586, *Streptococcus thermophilus* LMG 18311, *Thermoanaerobactertengcongensis* MB4(T), *Moorellathermoacetica* ATCC 39073, *Desulfotobacteriumhafniense* Y51, *Clostridium tetani* E88, *Clostridium perfringens* SM101, *Clostridium difficile* QCD-32g58, *Clostridium botulinum* Hall A Sanger, *Clostridium botulinum* F Langeland, *Clostridium botulinum* B1 штам Okra, *Clostridium botulinum* A3 штам Loch Maree, *Clostridium botulinum* A Hall, *Clostridium botulinum* A ATCC 19397, *Carboxydothermushydrogenoformans* Z-2901, *Staphylococcus epidermidis* RP62A, *Thermusthermophilus* HB8, *Thermusthermophilus* HB27, вид *Nostoc* PCC 7120, *Anabaena variabilis* ATCC 29413, вид *Synechococcus* OS тип B prime, вид *Synechococcus* OS тип A, *Porphyromonasgingivalis* W83, *Bacteroidesfragilis* YCH46, *Bacteroidesfragilis* NCTC9343, *Aquifexaeolicus* VF5, *Rubrobacterxylanophilus* DSM 9941, *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (лабораторний штам), *Mycobacterium tuberculosis* CDC1551, *Mycobacterium bovis* підвид *bovis* AF2122/97, *Frankiaalni* ACN14a, *Thermoplasma* volcanium GSS1, *Picrophilustorridus* DSM 9790, *Thermococcus* kodakarensis KOD1, *Pyrococcus* horikoshii OT3, *Pyrococcus* furiosus DSM 3638, *Pyrococcus* abyssi GE5, *Methanosarcinabarkerifusaro*, *Methanosarcinaacetivorans* C2A, *Methanococcoidesburtonii* DSM 6242, *Methanococcusjannaschii* DSM2661, *Methanobacteriumthermoautotrophicum* delta H, *Haloarculamarismortui* ATCC 43049, *Archaeoglobusfulgidus* DSM4304, *Pyrobaculum* aerophilum 1M2, *Sulfolobus* tokodaii штам 7, *Sulfolobus* solfataricus P2, *Sulfolobus* acidocaldarius DSM 639, *Aeropyrum* pernix K1. Інші приклади поліпептидів Cas6 відомі фахівцям в даній галузі, див., наприклад, члени групи поліпептидів COG1583 (доступні з кластерів ортологічних груп білків (COG) на веб-сторінці Інтернет-сайту National Center for Biotechnology Information, див. також Tatusov et al. (1997) Science 278:631-637 і Tatusov et al. (2003) BMC Bioinformatics 4(1):41), члени сімейства InterPro, що має номер доступу IPRO10156, Makarova et al. (2002) Nuc. Acids Res. 30:482-496 і Haft et al. (2005) PLoS Comput. Biol. 1(6):e60, 474-483).

[0124] Існує три типи систем CRISPR/Cas, які включають crPHK і білки Cas. Типи I і III мають Cas-ендонуклеази, які обробляють пре-crPHK, які, коли повністю перетворюються в crPHK, збирають мульти-Cas білковий комплекс, який здатен розщеплювати нуклеїнові кислоти, комплементарні crPHK.

[0125] В типі II систем CRISPR/Cas crPHK продукується з використанням різних механізмів, де транс-активуюча PHK (tracrPHK), комплементарна повторним послідовностям в пре-crPHK, спричиняє процесинг дволанцюгово-специфічною рибонуклеазою III в присутності білка Cas9. Потім Cas9 здатен розщеплювати ДНК-мішень, комплементарну зрілій crPHK, проте, розщеплення за допомогою Cas 9 залежить від утворення пар основ між crPHK і ДНК-мішенню і від присутності короткого мотиву в crPHK, названого послідовністю PAM (фотоспейсерний прилеглий мотив) (див. Qi et al. (2013) Cell 152:1173). Крім того, tracrPHK повинна також бути присутньою у вигляді пар основ з crPHK на своєму 3'-кінці, і ця асоціація спричиняє активність Cas9.

[0126] Білок Cas9 має, принаймні, два нуклеазних домени: один нуклеазний домен схожий на ендонуклеазу HNH, тоді як інший схожий на ендонуклеазний домен Ruv. Як виявлено, домен типу HNH відповідає за розщеплення нитки ДНК, комплементарної crPHK, тоді як домен Ruv розщеплює некомплементарну нитку.

[0127] Потреби в комплексі crPHK-tracrPHK можна уникнути, використовуючи сконструйовану "односпрямовуючу PHK" (sgPHK), яка містить шпильки, зазвичай утворені шляхом відпаду crPHK і tracrPHK (див., Jinek et al. (2012) Science 337:816 і Cong et al. (2013) Scienceexpress/10.1126/science.1231143). В *S. pyogenes*, сконструйоване злиття tracrPHK:crPHK, або sgPHK, спрямовує Cas9 на розщеплення ДНК-мішені, коли дволанцюговий гетеродимер PHK:ДНК утворюється між Cas-асоційованими PHK і ДНК-мішенню. Ця система, що містить білок Cas9, і сконструйована sgPHK, що містить послідовність PAM, була використана для PHK-спрямованого редагування геному (див. Ramalingam, там же) і була корисна для редагування геному ембріона рибок даніо in vivo (див. Hwang et al. (2013) Nature Biotechnology 31(3):227) з ефективністю редагування, подібною до такої ZFN і TALEN.

[0128] В певних варіантах реалізації винаходу білок Cas може бути "функціональним похідним" білка Cas природного походження. "Функціональне похідне" природної послідовності поліпептиду являє собою сполуку, що має якісні біологічні властивості, спільні з природною послідовністю поліпептиду. "Функціональні похідні" включають фрагменти природної послідовності і похідні природної послідовності поліпептиду та їх фрагменти, за умови, що вони мають біологічну активність, спільну з відповідною природною послідовністю поліпептиду, але не обмежуються ними. Біологічна активність, передбачена даним документом, є здатністю функціонального похідного гідролізувати субстрат ДНК на фрагменти. Термін "похідне" охоплює варіанти амінокислотної послідовності поліпептиду, ковалентні модифікації та їх злиття.

[0129] "Поліпептид Cas" охоплює непроцесований поліпептид Cas, ферментативно активний фрагмент поліпептиду Cas і ферментативно активні похідні поліпептиду Cas та їх фрагменти. Придатні похідні поліпептиду Cas або їх фрагменти включають мутанти, злиття, ковалентні модифікації білка Cas або їх фрагменти, але не обмежуються ними.

[0130] Білки Cas і поліпептиди Cas можуть бути одержані з клітин або синтезовані хімічно або за допомогою комбінації цих двох процедур. Клітиною може бути клітина, яка природним чином продукує білок Cas, або клітина, яка природним чином продукує білок Cas, і створена методом генної інженерії для продукування ендogenous білка Cas при більш високих рівнях експресії або для продукування білка Cas з ендogenous введеної нуклеїнової кислоти, де нуклеїнова кислота кодує Cas, такий самий як і ендogenous Cas, або відмінний. В деяких випадках клітина не продукує білок Cas природним чином, а є створеною методом генної інженерії для продукування білка Cas.

[0131] Система CRISPR/Cas також може бути використана для інгібування генної експресії. Lei et al. (2013) Cell 152(5):1173-1183 показав, що каталітично «мертвий» Cas9, що не має ендонуклеазної активності, коли спільно експресується із спрямовуючою РНК, утворює ДНК-розпізнаючий комплекс, який дозволяє цілеспрямовано втручатись в транскрипційну елонгацію, зв'язування РНК полімерази або зв'язування фактору транскрипції. Ця система, названа CRISPR інтерференцією (CRISPRi), може ефективно пригнічувати експресію генів-мішеней.

[0132] Крім того, були розроблені білки Cas, які містять мутації в своїх доменах розщеплення, щоб зробити їх нездатними індукувати DSB, а замість цього вводять одноланцюговий розрив в ДНК-мішень ("Cas9 нікующий фермент", див. Cong et al., там же).

[0133] Білки Cas згідно з винаходом можуть зазнавати мутагенезу з метою зміни функціональності. Приклади методів селекції, включаючи фаговий дисплей і двогибридні системи, описані в патентах США 5 789 538; 5 925 523; 6 007 988; 6 013 453; 6 410 248; 6 140 466; 6 200 759 і 6 242 568; а також WO 98/37186; WO 98/53057; WO 00/27878; WO 01/88197 і GB 2 338 237.

РНК-компоненти CRISPR/Cas

[0134] Cas9 зв'язана система CRISPR/Cas містить два некодуючих РНК-компоненти: tracrPНК і має пре-crPНК, що містять нуклеазні спрямовуючі послідовності (спейсери), розділені проміжками однакових прямих повторів (DR). Для використання системи CRISPR/Cas для завершення геномної інженерії повинні бути наявними обидві функції цих РНК (див. Cong et al, (2013) Scienceexpress 1/10.1126/science 1231143). В деяких варіантах реалізації винаходу tracrPНК і пре-crPНК постачаються окремими експресуючими конструктами або у вигляді окремих РНК. В інших варіантах реалізації винаходу конструюють химерну РНК, де генетично сконструйовану зрілу crPНК (що надає специфічність до мішені) зливають з tracrPНК (яка забезпечує взаємодію з Cas9) для створення гібриду химерна cr-РНК-tracrPНК (також названого односпрямовуючою РНК). (див. Jinek, там же і Cong, там же).

Химерні або sgPНК можна сконструювати таким чином, щоб вони містили послідовність, комплементарну будь-якій бажаній мішені. РНК містять 22 основи, комплементарні мішені та у вигляді G[n19], за якими слідує фотоспейсерний прилеглий мотив (PAM) у вигляді NGG. Таким чином, в одному способі, sgPНК можуть бути розроблені з використанням відомих ZFN, націлених в цільовий ген шляхом (i) вирівнювання послідовності розпізнавання гетеродимеру ZFN з еталонною послідовністю релевантного геному (людською, мишачою або певного виду рослин); (ii) ідентифікації спейсерної ділянки між напівсайтами ZFN; (iii) ідентифікації локалізації мотиву G[N20]GG, найближчого до спейсерної ділянки (коли більше ніж один такий мотив перекриває спейсер, мотив, який центрується відносно вибраного спейсеру); (iv) використання мотиву як кору sgPНК. Цей метод переважно опирається на випробувані нуклеазні мішені. Як альтернатива, sgPНК можуть бути розроблені для націлювання на будь-яку цільову ділянку просто шляхом ідентифікації придатної послідовності-мішені, яка відповідає формулі G[n20]GG.

Сайти-мішені

[0135] Як детально описано вище, ДНК-зв'язуючі домени можуть конструюватись для

зв'язування будь-якої переважної послідовності в локусі, наприклад, глобінового гена або гена «затишної гавані». Сконструйований ДНК-зв'язуючий домен може мати нову специфічність зв'язування у порівнянні з ДНК-зв'язуючим доменом природного походження. Способи конструювання включають конструктивну розробку і різні типи відбору, але не обмежуються ними. Конструктивна розробка включає, наприклад, використання баз даних, що містять триплетні (або квадруплетні) нуклеотидні послідовності та індивідуальні амінокислотні послідовності «цинкових пальців», в яких кожна триплетна або квадруплетна нуклеотидна послідовність асоціюється з однією або більше амінокислотними послідовностями «цинкових пальців», які зв'язують окрему триплетну або квадруплетну послідовність. Див., наприклад, патенти США 6 453 242 і 6 534 261, включені до даного документу шляхом посилання в повному обсязі. Конструктивна розробка TAL-ефекторних доменів також проводиться. Див., наприклад, патентну публікацію США № 20110301073.

[0136] Приклади методів відбору, застосовувані для ДНК-зв'язуючих доменів, включаючи фаговий дисплей і двогібридні системи, розкриті в патентах США 5 789 538; 5 925 523; 6 007 988; 6 013 453; 6 410 248; 6 140 466; 6 200 759 і 6,242,568; а також WO 98/37186; WO 98/53057; WO 00/27878; WO 01/88197 і GB 2,338,237.

[0137] Відбір сайтів-мішеней; нуклеаз і методів розробки і конструювання злитих білків (і полінуклеотидів, що їх кодують) відомі фахівцям в даній галузі техніки і детально описані в патентних публікаціях США № 20050064474 і 20060188987, включених до даного документу шляхом посилання в повному обсязі.

[0138] Крім того, як розкрито в цьому документі та інших посиланнях, ДНК-зв'язуючі домени (наприклад, мультипальцевого білка «цинкові пальці») можуть об'єднуватись разом з використанням будь-якої придатної лінкерної послідовності, включаючи, наприклад, лінкери з 5 амінокислот в довжину. Див., наприклад, патенти США № 6479626; 6903185; і 7153949 стосовно прикладів лінкерних послідовностей з 6 або більше амінокислот в довжину. Білки, описані в даному документі, можуть включати будь-яку комбінацію придатних лінкерів між окремими «цинковими пальцями» білка. Див. також патентну публікацію № 20110287512.

Донори

[0139] Як відмічалось вище, екзогенну послідовність (також названу “донорською послідовністю” або “донором” або “трансгеном”) вставляють, наприклад, для коригування мутантного гена або для підвищення експресії гена дикого типу. Цілком очевидно, що донорська послідовність, як правило, не ідентична геномній послідовності, на місце якої вона вміщується. Донорська послідовність може містити негомологічну послідовність, фланковувану двома ділянками гомології, щоб забезпечити ефективну HDR в цільовому місцеположенні. Крім того, донорські послідовності можуть містити векторну молекулу, що містить послідовності, які не є гомологічними цільовій ділянці в клітинному хроматині. Донорська молекула може містити декілька ділянок гомології, що перекриваються, до клітинного хроматину. Наприклад, для спрямованої вставки послідовностей, які зазвичай не присутні в цільовій ділянці, вказані послідовності можуть бути в молекулі донорської нуклеїнової кислоти і фланкуватись ділянками гомології до послідовності в цільовій ділянці.

[0140] В даному документі описані способи спрямованої вставки будь-якого полінуклеотиду для вставки у вибране місцеположення. Полінуклеотиди для вставки також можуть називатись “екзогенними” полінуклеотидами, “донорськими” полінуклеотидами або молекулами або “трансгенами”. Донорським полінуклеотидом може бути ДНК або РНК, одноланцюгова та/або дволанцюгова, і вводиться в клітину в лінійній або кільцевій формі. Див., наприклад, патентні публікації США № 20100047805, 20110281361, 20110207221 і заявку США № 13/889162. Донорська(і) послідовність(і) може міститися в межах ДНК МС, яка може бути введена в молекулу в лінійній або кільцевій формі. Якщо вводиться в лінійній формі, то кінці донорської послідовності можуть бути захищеними (наприклад, від екзонуклеолітичної деградації) за допомогою методів, відомих фахівцям в даній галузі техніки. Наприклад, два або більше дидезоксинуклеотидних залишків додають до 3'-термінусу лінійної молекули та/або самокомплементарні олігонуклеотиди лігують до одного або двох кінців. Див., наприклад, Chang et al. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:4959-4963; Nehls et al. (1996) Science 272:886-889. Додаткові методи захисту екзогенних полінуклеотидів включають додавання кінцевих аміногруп і використання модифікованих міжнуклеотидних зв'язків, таких як, наприклад, фосфортіоати, фосфорамідати і О-метилрибоза або залишки дезоксирибози, але не обмежуються ними.

[0141] Полінуклеотид може вводиться в клітину у вигляді частини векторної молекули, що має додаткові послідовності, такі як, наприклад, точки початку реплікації, промотори і гени, кодуєчі резистентність до антибіотиків. Більше того, донорські полінуклеотиди можуть вводиться у вигляді «оголеної» нуклеїнової кислоти, у вигляді нуклеїнової кислоти в комплексі з

агентом, таким як ліпосома або поллоксамер, або може доставлятися за допомогою вірусів (наприклад, аденовірусів, AAV, герпесвірусу, ретровірусу, лентивірусу і інтегразодефектного лентивірусу (IDLV)).

[0142] В певних варіантах реалізації винаходу дволанцюговий донор включає послідовності (наприклад, кодуєчі послідовності, також відомі як трансгени) більше ніж 1 т.н. в довжину, наприклад від 2 до 200 т.н., від 2 до 10 т.н. (або будь-яке цілочисленне значення між ними). Дволанцюговий донор також включає, принаймні, один нуклеазний сайт-мішень, наприклад. В певних варіантах реалізації винаходу донор включає, принаймні, 1 сайт-мішень, наприклад, для використання з CRISPR/Cas, або 2 сайти-мішені, наприклад, для пари ZFN або TALEN. Зазвичай, нуклеазні сайти-мішені знаходяться поза трансгенних послідовностей, наприклад, 5' та/або 3' до трансгенних послідовностей для розщеплення трансгена. Нуклеазний(і) сайт(и) розщеплення може бути для будь-якої нуклеази. В певних варіантах реалізації винаходу нуклеазний(і) сайт(и) розщеплення, що міститься в дволанцюговому донорі, призначений для тієї самої нуклеази, що використовується для розщеплення ендегенної мішені, в яку розщеплений донор інтегрується шляхом гомологонезалежних методів.

[0143] Донор зазвичай вставляється таким чином, що його експресія регулюється ендегенним промотором в сайті вставки, а саме промотором, який регулює експресію ендегенного гена, в який вставляється донор (наприклад, глобіновий, AAVS1 і т.д.). Проте, очевидно, що донор може містити промотор та/або енхансер, наприклад, конститутивний промотор або індукційний або тканиноспецифічний промотор.

[0144] Донорська молекула може вставлятися в ендегенний ген таким чином, що експресуються всі, деякі або ні один з ендегенних генів. Наприклад, трансген, як описано в даному документі, може вставлятися в глобіновий локус, так що експресуються деякі або жодна з ендегенних глобінових послідовностей, наприклад, у вигляді злиття з трансгеном. В інших варіантах реалізації винаходу трансген (наприклад, з або без глобінових кодуєчих послідовностей) інтегрується в будь-який ендегенний локус, наприклад, локус «затишної гавані». Див., наприклад, патентні публікації США 20080299580; 20080159996 і 201000218264.

[0145] Коли додаткові послідовності (наприклад, глобінові послідовності, ендегенні або частина трансгена) експресуються з трансгеном, то додаткові (наприклад, глобінові) послідовності можуть бути непроцесованими послідовностями (дикого типу або мутантними) або неповними послідовностями. Необмежуючі приклади функції цих непроцесованих і неповних послідовностей, наприклад, глобінкодуєчих послідовностей, включають підвищення часу напівжиття в сироватці поліпептиду, що експресується за допомогою трансгена (наприклад, терапевтичного гена) та/або діючого як носій.

[0146] Крім того, хоча цього і не потрібно для експресії, екзогенні послідовності можуть також включати послідовності, що регулюють транскрипцію або трансляцію, наприклад, промотори, енхансери, інсулятори, ділянку внутрішньої посадки рибосоми, послідовності, що кодують білки 2A, та/або сигнали поліаденілування.

[0147] Трансгени, внесені в донорські послідовності, описані в даному документі, можуть бути виділеними з плазмід, клітин або інших джерел з використанням стандартних методик, відомих з рівня техніки, таких як PCR. Використовувані донори можуть включати різні типи топології, включаючи кільцеві надспіральні, кільцеві розслаблені, лінійні і т.п. Як альтернатива, вони можуть бути хімічно синтезованими з використанням стандартних методик синтезу олігонуклеотидів. Крім того, донори можуть бути метильованими або неметильованими. Донори можуть бути у вигляді штучних бактеріальних або дріжджових хромосом (BAC або YAC).

[0148] Двоспіральні донорські полінуклеотиди, описані в даному документі, можуть включати одну або більше неприродних основ та/або скелетів. Зокрема, вставку донорської молекули з метильованими цитозинами можна здійснити, застосовуючи методи, описані в даному документі, для досягнення стану транскрипційного спокою в цільовій ділянці.

[0149] Екзогенний (донорський) полінуклеотид може містити будь-яку цільову послідовність (екзогенну послідовність). Приклади екзогенних послідовностей включають будь-яку поліпептидкокуючу послідовність (наприклад, кДНА), промоторні послідовності, енхансерні послідовності, епітопні мітки, маркерні гени, сайти розпізнавання ферментного розщеплення і різні типи експресійних конструктів, але не обмежуються ними. Маркерні гени включають послідовності, що кодують білки, які опосередковують резистентність до антибіотиків (наприклад, резистентність до ампіциліну, резистентність до неоміцину, резистентність до G418, резистентність до пуроміцину), послідовності, що кодують забарвлені або флуоресцентні, або люмінесцентні білки (наприклад, зелений флуоресцентний білок, посилений зелений флуоресцентний білок, червоний флуоресцентний білок, люциферазу), і білки, які опосередковують підвищений ріст клітин та/або генну ампліфікацію (наприклад,

дигідрофолатредуктазу), але не обмежуються ними. Епітопні мітки включають, наприклад, одну або більше копій FLAG, His, myc, Tap, HA або будь-яку виявлювану амінокислотну послідовність.

5 [0150] В переважному варіанті реалізації винаходу екзогенна послідовність (трансген) містить полінуклеотид, що кодує будь-який поліпептид, експресія якого бажана в клітині, включаючи антитіла, антигени, ферменти, рецептори (клітинної поверхні або ядерні), гормони, лімфокіни, цитокіни, репортерні поліпептиди, фактори росту і функціональні фрагменти будь-якого з вищевикладених, але не обмежуються ними. Кодуючими послідовностями можуть бути, наприклад, кДНК.

10 [0151] В певних варіантах реалізації винаходу екзогенні послідовності можуть містити маркерний ген (описаний вище), який дозволяє вибирати клітини, які будуть зазнавати наміченої інтеграції, і приєднану послідовність, кодує додатову функціональність. Необмежуючі приклади маркерних генів включають GFP, маркери лікарської селекції і т.п.

15 [0152] Додаткові генні послідовності, які можуть бути вставлені, можуть включати, наприклад, гени дикого типу для заміни мутованих послідовностей. Наприклад, послідовність гена бета-глобіну дикого типу може бути вставлена в геном стовбурової клітини, в якій здійснилась мутація ендогенної копії гена. Копія дикого типу може бути вставлена в ендогенний локус або, як альтернатива, може бути спрямована в локус «затишної гавані».

20 [0153] Конструкції таких касет експресії, разом з методиками згідно з даним описом, використовують методології, добре відомі з рівня техніки молекулярної біології (див., наприклад, Ausubel або Maniatis). Перед використанням касет експресії для одержання трансгенних тварин, реактивність касети експресії на стресовий індуктор, зв'язаний з елементами контролю селекції, може бути протестована за допомогою введення касети експресії в придатну клітинну лінію (наприклад, первинні клітини, трансформовані клітини або іморталізовані клітинні лінії).

25 [0154] Крім того, не дивлячись на те, що для експресії не потрібно, але екзогенні послідовності можуть бути послідовностями, які регулюють транскрипцію або трансляцію, наприклад, промоторами, енансерами, інсуляторами, ділянками внутрішньої посадки рибосоми, послідовностями, що кодують пептиди 2A, та/або сигналами поліаденилювання. Крім того, контрольні елементи цільових генів можуть бути функціонально зв'язаними з генами-репортерами для створення химерних генів (наприклад, репортерних касет експресії).

30 [0155] Також може бути досягнута цільова вставка некодуєчої послідовності нуклеїнової кислоти. Послідовності, що кодують антисмислові РНК, РНКі, кшРНК і мікроРНК (міРНК), також можуть бути використані для цільових вставок.

35 [0156] В додаткових варіантах реалізації винаходу донорська нуклеїнова кислота може містити некодуєчі послідовності, які є специфічними сайтами-мішенями для додаткових розробок нуклеаз. Згодом, додаткові нуклеази можуть експресуватись в клітинах, так що оригінальна донорська молекула розщеплюється і модифікується шляхом вставки іншої цільової донорської молекули. Таким чином, можуть бути одержані повторні інтеграції донорських молекул, які допускають скринінг ознак в певному цільовому локусі або в локусі «затишної гавані».

40 **Доставка**

[0157] Нуклеази, полінуклеотиди, що кодують ці нуклеази, донорські полінуклеотиди і композиції, що містять білки та/або полінуклеотиди, описані в даному документі, можуть бути доставлені in vivo або ex vivo будь-яким придатним способом.

45 [0158] Способи доставки нуклеаз, як описано в даному документі, описані, наприклад, в патентах США № 6453242; 6503717; 6534261; 6599692; 6607882; 6689558; 6824978; 6933113; 6979539; 7013219 і 7163824, опис яких включений до даного документу шляхом посилання в повному обсязі.

50 [0159] Нуклеази та/або донорські конструкти, як описано в даному документі, можуть також бути доставлені, використовуючи вектори, що містять послідовності, що кодують один або більше білків «цинкові пальці» або TALEN. Може бути використана будь-яка векторна система, включаючи плазмідні вектори, ретровірусні вектори, лентивірусні вектори, аденовірусні вектори, поксвірусні вектори, герпесвірусні вектори, аденоасоційовані вірусні вектори і т. п. Див. також патенти США № 6534261; 6607882; 6824978; 6933113; 6979539; 7013219 і 7163824, включені до даного документу шляхом посилання в повному обсязі, але не обмежуються ними. Крім того, очевидно, що будь-який з цих векторів може містити одну або більше послідовностей, необхідних для лікування. Таким чином, коли в клітину вводиться одна або більше нуклеаз і донорський конструкт, то нуклеази та/або донорський полінуклеотид можуть переноситися одним і тим самим вектором або різними векторами. Коли використовують декілька векторів, то кожний вектор може містити послідовність, що кодує одну або декілька нуклеаз та/або

донорських конструктів.

[0160] Звичайні вірусні і невірусні способи переносу генів можуть бути використані для введення нуклеїнових кислот, що кодують нуклеази і донорські конструкти, в клітини (наприклад, клітини ссавців) або тканини-мішені. Невірусні векторні системи доставки включають ДНК-плазмиди, «оголену» нуклеїнову кислоту і нуклеїнову кислоту в комплексі з носієм, таким як ліпосома або поллоксамер. Вірусні векторні системи доставки включають ДНК і РНК віруси, які мають епісомальні або інтегровані геноми після доставки в клітину. Для огляду процедур генної терапії див. Anderson, *Science* 256:808-813 (1992); Nabel & Felgner, *TIBTECH* 11:211-217 (1993); Mitani & Caskey, *TIBTECH* 11:162-166 (1993); Dillon, *TIBTECH* 11:167-175 (1993); Miller, *Nature* 357:455-460 (1992); Van Brunt, *Biotechnology* 6(10):1149-1154 (1988); Vigne, *Restorative Neurology and Neuroscience* 8:35-36 (1995); Kremer & Perricaudet, *British Medical Bulletin* 51(1):31-44 (1995); Haddada et al., в *Current Topics in Microbiology and Immunology* Doerfler and Böhm (eds.) (1995); і Yu et al., *Gene Therapy* 1:13-26 (1994).

[0161] Способи невірусної доставки нуклеїнових кислот включають електропорацію, ліпофекцію, мікроін'єкції, балістичну трансфекцію, віросоми, ліпосоми, імуноліпосоми, полікатіонні або ліпідні кон'югати нуклеїнових кислот, «оголені ДНК», штучні віріони і агентопідвищуюче поглинання ДНК. Для доставки нуклеїнових кислот також може бути застосована сонопорація, використовуюча, наприклад, систему Sonitron 2000 (Rich-Mar).

[0162] Додаткові приклади систем доставки нуклеїнових кислот включають системи, надані Amaxa Biosystems (Cologne, Germany), Maxcyte, Inc. (Rockville, Maryland), BTX Molecular Delivery Systems (Holliston, MA) і Copernicus Therapeutics Inc. (див., наприклад, патент США № 6008336). Ліпофекція описана, наприклад, в патентах США № 5049386; 4946787 і 4897355), а реагенти для ліпофекції мають в продажу (наприклад, Transfectam(і Lipofectin(). Катіонні і нейтральні ліпіди, які придатні для ефективної рецептор-розпізнаючої ліпофекції полінуклеотидів, включають ліпіди Felgner, WO 91/17424, WO 91/16024.

[0163] Одержання комплексів ліпід:нуклеїнова кислота, включаючи цільові ліпосоми, такі як імуноліпідні комплекси, добре відомі з рівня техніки (див., наприклад, Crystal, *Science* 270:404-410 (1995); Blaese et al., *Cancer Gene Ther.* 2:291-297 (1995); Behr et al., *Bioconjugate Chem.* 5:382-389 (1994); Remy et al., *Bioconjugate Chem.* 5:647-654 (1994); Gao et al., *Gene Therapy* 2:710-722 (1995); Ahmad et al., *Cancer Res.* 52:4817-4820 (1992); патенти США № 4186183, 4217344, 4235871, 4261975, 4485054, 4501728, 4774085, 4837028 і 4946787).

[0164] Додаткові способи доставки включають використання упакування нуклеїнових кислот, призначених для доставки, в носії EnGeneIC (EDV). Ці EDV спеціально доставляються в тканини-мішені, використовуючи біспецифічні антитіла, де одне плече антитіла має специфічність до тканини-мішені, а інше – специфічність до EDV. Антитіло доставляє EDV до цільової клітинної поверхні, а потім EDV доставляється в клітину за допомогою ендоцитозу. Опинившись в клітині, вміст вивільняється (див. MacDiarmid et al (2009) *Nature Biotechnology* 27(7):643).

[0165] Використання РНК або ДНК вірусних систем для доставки нуклеїнових кислот, що кодують сконструйовані ZFP, користується перевагами високорозвинутих процесів націлювання вірусів в певні клітини в тілі та спрямованої міграції корисного вірусного навантаження в ядро. Вірусні вектори можуть вводиться безпосередньо суб'єктам (in vivo) або вони можуть бути використані для обробки in vitro, а модифіковані клітини вводиться суб'єктам (ex vivo). Звичайні вірусні системи доставки ZFP включають ретровірусні, лентивірусні, аденовірусні, аденоасоційовані, осповакцинні і герпетичні вірусні вектори для генного переносу, але не обмежуються ними. Інтеграція в геном-хазяїн можлива за допомогою методів генного переносу ретровірусами, лентивірусами і аденоасоційованими вірусами, часто приводячи до довготривалої експресії вставленого трансгена. Крім того, висока ефективність трансдукції спостерігається в багатьох різних клітинних типах і тканинах-мішенях.

[0166] Тропізм ретровірусу може бути змінений шляхом введення чужорідних оболонкових білків, розширення потенційної популяції-мішені клітин-мішеней. Лентивірусні вектори є ретровірусними векторами, які здатні трансдукувати або інфікувати неподільні клітини і, як правило, продукують високі вірусні титри. Вибір ретровірусної системи переносу генів залежить від тканини-мішені. Ретровірусні вектори складаються з цис-діючих довгих кінцевих повторів з упаковкою місткістю до 6-10 т.н. чужорідної послідовності. Мінімально цис-діючі LTR є достатніми для реплікації і упаковки векторів, які потім використовуються для інтеграції терапевтичного гена в клітини-мішені, щоб забезпечити постійну експресію трансгена. Широко використовувані ретровірусні вектори включають ті, які базуються на вірусі мишачого лейкозу (MuLV), вірусі лейкозу гібонів (Galv), вірусі імунодефіциту мавп (SIV), вірусі імунодефіциту людини (HIV), а також їх комбінації (див., наприклад, Buchscher et al., *J. Virol.* 66:2731-2739

(1992); Johann et al., J. Virol. 66:1635-1640 (1992); Sommerfelt et al., Virol. 176:58-59 (1990); Wilson et al., J. Virol. 63:2374-2378 (1989); Miller et al., J. Virol. 65:2220-2224 (1991); PCT/US94/05700).

[0167] В застосуваннях, для яких переважною є тимчасова експресія, можуть бути використані аденовірусні системи. Аденовірусні вектори здатні з дуже високою ефективністю трансдукувати багато типів клітин і не потребують поділу клітин. З такими векторами можуть бути досягнуті високі титри і високі рівні експресії. Цей вектор може бути одержаний в великих кількостях у відносно простій системі. Вектори аденоасоційованих вірусів ("AAV") також використовуються для трансдукції клітин нуклеїновими кислотами-мішенями, наприклад, при *in vitro* продукуванні нуклеїнових кислот і пептидів, і *in vivo* і *ex vivo* процедурах генної терапії (див., наприклад, West et al., Virology 160:38-47 (1987); патент США № 4797368; WO 93/24641; Kotin, Human Gene Therapy 5:793-801 (1994); Muzyczka, J. Clin. Invest. 94:1351 (1994). Конструювання рекомбінантних векторів AAV описане в ряді публікацій, включаючи патент США № 5173414; Tratschin et al., Mol. Cell. Biol. 5:3251-3260 (1985); Tratschin, et al., Mol. Cell. Biol. 4:2072-2081 (1984); Hermonat & Muzyczka, PNAS 81:6466-6470 (1984); і Samulski et al., J. Virol. 63:03822-3828 (1989).

[0168] На даний час доступні, принаймні, шість вірусовекторних підходів для переносу генів в клінічних дослідженнях, які використовують підходи, включаючи комплементацию дефектних векторів за допомогою генів, вставлених в лінії клітин-помічників для створення трансдукційного агента.

[0169] pLASN і MFG-S є прикладами ретровірусних векторів, які були використані в клінічних дослідженнях (Dunbar et al., Blood 85:3048-305 (1995); Kohn et al., Nat. Med. 1:1017-102 (1995); Malech et al., PNAS 94:22 12133-12138 (1997)). PA317/pLASN був першим терапевтичним вектором, використаним в дослідженні генної терапії. (Blaese et al., Science 270:475-480 (1995)). Ефективність трансдукції 50 % або більше була виявлена для упакування векторів MFG-S. (Ellem et al., Immunol Immunother. 44(1):10-20 (1997); Dranoff et al., Hum. Gene Ther. 1:111-2 (1997)).

[0170] Рекомбінантні адено-асоційовані вірусні вектори (rAAV) є перспективними альтернативними системами доставки генів, що базуються на дефектному і непатогенному типі 2 парвовірусного аденоасоційованого вірусу. Всі вектори одержані з плазмиди, яка зберігає тільки 145 п.о. інвертованих кінцевих повторів AAV, фланкуючих трансгенні касети експресії. Ефективна передача генів і стабільна доставка трансгена завдяки інтеграції в геноми трансдукованої клітини є основними характеристиками для цієї векторної системи. (Wagner et al., Lancet 351:9117 1702-3 (1998), Kearns et al., Gene Ther. 9:748-55 (1996)). Інші серотипи AAV, включаючи AAV1, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV8, AAV9 і AAVrh10 і всі їх варіанти також можуть бути використані згідно з даним винаходом.

[0171] Реплікаційно дефіцитні рекомбінантні аденовірусні вектори (Ad) можуть бути одержані при високих титрах і легко інфікувати декілька різних типів клітин. Більшість аденовірусних векторів розроблено таким чином, що трансген замінює гени Ad E1a, E1b та/або E3; потім реплікація дефектного вектора розповсюджується в людських клітинах 293, які відновлюють функцію видалених генів *in trans*. Вектори Ad можуть трансдукувати різні типи тканин в живому організмі, включаючи диференційовані клітини, які не діляться, такі як ті, що в печінці, нирках і м'язах. Звичайні вектори Ad мають велику пропускну здатність. Приклад використання вектору Ad в клінічних дослідженнях включає полінуклеотидну терапію для протипухлинної імунізації внутрішньом'язовою ін'єкцією (Sternan et al., Hum. Gene Ther. 7:1083-9 (1998)). Додаткові приклади використання аденовірусних векторів для переносу генів в клінічних дослідженнях включають Rosenecker et al., Infection 24:1 5-10 (1996); Sternan et al., Hum. Gene Ther. 9:7 1083-1089 (1998); Welsh et al., Hum. Gene Ther. 2:205-18 (1995); Alvarez et al., Hum. Gene Ther. 5:597-613 (1997); Topf et al., Gene Ther. 5:507-513 (1998); Sternan et al., Hum. Gene Ther. 7:1083-1089 (1998).

[0172] Упаковка клітин використовується для формування вірусних частинок, здатних інфікувати клітини-хазяї. Такі клітини включають клітини 293, які упаковують аденовірус, і клітини ψ 2 або клітини PA317, які упаковують ретровірус. Вірусні вектори, використовувані в генній терапії, як правило, продукуються клітинною лінією, яка упаковує вектор нуклеїнової кислоти в вірусну частинку. Вектори зазвичай містять мінімальні вірусні послідовності, необхідні для упаковки і наступної інтеграції до хазяїна (якщо доступний), інші вірусні послідовності замінюються касетою експресії, що кодує білок, що підлягає експресії. Вірусні функції, яких бракує, поставляються в транспакуючу клітинну лінію. Наприклад, вектори AAV, використовувані в генній терапії, як правило, володіють тільки послідовностями інвертованого кінцевого повтору (ITR) з геному AAV, які необхідні для упаковки і інтеграції в геном хазяїна. Вірусна ДНК упаковується в клітинну лінію, яка містить допоміжну плазмиду, що кодує інші гени

AAV, а саме реп і кеп, але не має послідовності ITR. Клітинна лінія також інфікується аденовірусом як помічником. Допоміжний вірус сприяє реплікації вектора AAV і експресії генів AAV з плазміди-помічника. Плазміда-помічник не упаковує в значних кількостях через відсутність послідовностей ITR. Контамінація аденовірусом може бути зменшена, наприклад,

5 тепловою обробкою, до якої аденовірус є більш чутливим, ніж AAV.

[0173] В багатьох застосуваннях генної терапії бажано, щоб вектор для генної терапії доставлявся з високим ступенем специфічності до конкретного типу тканини. Відповідно, вірусний вектор може бути змінений, щоб мати специфічність для даного типу клітин шляхом експресії ліганду у вигляді злитого білка з вірусним білком оболонки на зовнішній поверхні

10 вірусу. Ліганд вибирають таким чином, щоб мати спорідненість до рецептору, який, як відомо, присутній в клітинному типі, що становить інтерес. Наприклад, Han et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:9747-9751 (1995), повідомили, що вірус мишачого лейкозу Молоні може бути змінений, щоб експресувати людський херегулін, злитий з gp70, а рекомбінантний вірус інфікує певні

15 ракові клітини молочної залози людини, що експресують людський рецептор епідермального фактору росту. Цей принцип може бути поширений на інші пари клітин-мішеней для вірусів, в яких клітина-мішень експресує рецептор, а вірус експресує злитий білок, що містить ліганд для рецептора клітинної поверхні. Наприклад, нитчастий фаг може бути сконструйований таким

20 чином, щоб відтворювати фрагменти антитіл (наприклад, Fab або Fv), які мають афінність специфічності зв'язування з практично будь-яким вибраним клітинним рецептором. Хоча наведений вище опис належить, перш за все, до вірусних векторів, ті самі принципи можуть бути застосовані до невірусних векторів. Такі вектори можуть бути сконструйовані таким чином, щоб містити специфічні послідовності поглинання, які сприяють поглинанню певних клітин-мішеней.

[0174] Вектори генної терапії можуть доставлятися *in vivo* шляхом введення окремому

25 суб'єкту, як правило, шляхом системного введення (наприклад, інтравенозної, інтраперитонеальної, інтрамускулярної, субдермальної або інтракраніальної інфузії) або місцевого застосування, як описано нижче. З іншого боку, вектори можуть доставлятися в клітини *ex vivo*, такі як клітини, експлантовані від індивідуального пацієнта (наприклад, лімфоцити, клітини кісткового мозку, тканини біопсії) або універсальних донорів гемопоетичних

30 стовбурових клітин, з наступною реімплантацією клітин в тіло пацієнта, як правило, після відбору клітин, які мають інкорпорований вектор.

[0175] Вектори (наприклад, ретровіруси, аденовіруси, ліпосоми і т.п.), що містять нуклеази та/або донорські конструкти, також можуть бути введені безпосередньо в організм для трансдукції клітин в живому організмі. Крім того, може бути введена "оголена" ДНК. Введення

35 здійснюють будь-яким шляхом, зазвичай використовуваним для введення молекули в остаточний контакт з клітинами крові або тканини, включаючи ін'єкції, інфузії, місцеве введення і електропорацію, але не обмежуються ними. Придатні способи введення таких нуклеїнових кислот доступні і добре відомі фахівцям в даній галузі техніки, і, хоча може бути використаний

40 більше ніж один шлях для введення конкретної композиції, конкретний шлях часто може забезпечити більш негайну і більш ефективну реакцію, ніж інший шлях.

[0176] Вектори, придатні для введення полінуклеотидів, описаних в даному документі, включають неінтегруючі лентивірусні вектори (IDLV). Див., наприклад, Ory et al. (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:11382-11388; Dull et al. (1998) J. Virol. 72:8463-8471; Zuffery et al. (1998) J. Virol. 72:9873-9880; Follenzi et al. (2000) Nature Genetics 25:217-222; патентну публікацію №

45 2009/054985.

[0177] Фармацевтично прийнятні носії частково визначаються конкретною композицією, що підлягає введенню, а також конкретним способом, застосовуваним для введення композиції. Таким чином, існує велике різноманіття придатних складів доступних фармацевтичних композицій, як описано нижче (див., наприклад, Remington's Pharmaceutical Sciences, 17th ed.,

50 1989).

[0178] Очевидно, що нуклеазокодуєчі послідовності і донорські конструкти можуть бути доставлені з використанням тих самих або різних систем. Наприклад, донорський полінуклеотид може доставлятися за допомогою плазміди, в той час як одна або більше нуклеаз можуть доставлятися за допомогою вектору AAV. Крім того, різні вектори можуть бути введені одним і

55 тим самим або різними шляхами (внутрішньом'язово, ін'єкцією в хвостову вену, іншими внутрішньовенними ін'єкціями, внутрішньоочеревинним введенням та/або внутрішньом'язовою ін'єкцією). Вектори можуть бути доставлені одночасно або в будь-якій послідовності.

[0179] Таким чином, даний винахід включає *in vivo* або *ex vivo* лікування захворювань і станів, які сприйнятливі до вставки трансгенів, що кодуєть терапевтичний білок, наприклад,

60 лікування гемоглобінопатій шляхом нуклеазоопосередкованої інтеграції гена, що кодує білок

глобіну. Композиції вводять пацієнту в кількості, ефективній для одержання бажаної концентрації терапевтичного поліпептиду в сироватці або органі-мішені, або клітинах. Введення може здійснюватись будь-якими способами, в яких полінуклеотиди доставляються в бажані клітини-мішені. Наприклад, передбачаються як *in vivo*, так і *ex vivo* способи. Внутрішньовенне введення у воротну вену є переважним способом введення. Інші *in vivo* способи введення включають, наприклад, безпосередню ін'єкцію в долі печінки або жовчну протоку і внутрішньовенні ін'єкції дистальніше печінки, в том числі через печінкову артерію, безпосередню ін'єкцію в паренхіму печінки, ін'єкцію в печінкову артерію та/або ретроградну ін'єкцію через біліарне дерево. *Ex vivo* способи введення включають трансдукцію *in vitro* резектованих гепатоцитів або інших клітин печінки з наступною інфузією трансдукованих, резектованих гепатоцитів назад в портальну васкулатуру, паренхіму печінки або жовчні протоки пацієнта-людини, див., наприклад, Grossman et al., (1994) *Nature Genetics*, 6:335-341.

[0180] Ефективна кількість нуклеази і донора, що підлягають введенню, буде змінюватись від пацієнта до пацієнта в залежності від терапевтичного поліпептиду, що становить інтерес. Відповідно, ефективні кількості будуть краще визначатись лікарем, який вводить композиції, і відповідні дозування можуть бути легко визначені фахівцем в даній галузі техніки. Після надання достатнього часу для інтеграції і експресії (зазвичай 4-15 днів, наприклад), аналіз рівнів терапевтичного поліпептиду в сироватці або інших тканинах і порівняння з вихідним рівнем до введення буде визначати, чи є введена кількість занадто низькою, в потрібному діапазоні або занадто високою. Придатні схеми вихідного введення і наступних введень також змінюються, якщо це необхідно. Послідовні введення можуть здійснюватись через різні інтервали, щоденно, щорічно або раз на кілька років. Фахівцю в даній галузі техніки буде зрозуміло, що придатні імуносупресивні методи можуть бути рекомендовані, щоб уникнути інгібування або блокування трансдукції шляхом імуносупресії векторів доставки, див., наприклад, Vilquin et al., (1995) *Human Gene Ther.* 6:1391-1401.

[0181] Препарати для *ex vivo* і *in vivo* введень включають рідкі суспензії або емульговані рідини. Активні інгредієнти часто змішують з ексципієнтами, які є фармацевтично прийнятними і сумісними з активним інгредієнтом. Придатні наповнювачі включають, наприклад, воду, фізіологічний розчин, декстрозу, гліцерин, етанол або тому подібне та їх комбінації. Крім того, композиція може містити невелику кількість допоміжних речовин, таких як, зволожуючі або емульгуючі агенти, рН буферні агенти, стабілізуючі агенти або інші реагенти, які підвищують ефективність фармацевтичної композиції.

Застосування

[0182] Способи і композиції, розкриті в даному документі, є модифікацією експресії білка або корекцією аберантної генної послідовності, яка кодує білок, що експресується при генетичних захворюваннях, таких як серпоподібно-клітинна хвороба або таласемія. Таким чином, способи і композиції передбачені для лікування та/або профілактики таких генетичних захворювань. Геномне редагування, наприклад, стовбурових клітин, використовується для коригування аберантного гена, вставки гена дикого типу або зміни експресії ендогенного гена. Як необмежуючий приклад, ген дикого типу, наприклад, що кодує, принаймні, один глобін (наприклад, α - та/або β -глобін), може бути вставлений в клітини, щоб забезпечити глобінові білки, яких не вистачає та/або які відсутні в клітині, і, таким чином, лікувати генетичне захворювання, наприклад, гемоглобінопатію, спричинену патологічною експресією глобіну. Альтернативно або додатково, геномне редагування з або без введення відповідного донора може виправити патологічний ендогенний ген, наприклад, коригуючи точкову мутацію в α - або β -гемоглобіні, відновити експресію гена та/або лікувати генетичне захворювання, наприклад, серпоподібно-клітинну хворобу, та/або «нокаутувати» зміну (надлишкову експресію або репресію) будь-якого прямого або непрямого глобінового регуляторного гена (наприклад, інактивація γ -глобінового, регулюючого гена BCL11A або BCL11A-регулятора KLF1).

[0183] Способи і композиції згідно з винаходом також можуть бути використані за будь-яких обставин, де бажано надавати трансген, що кодує один або більше терапевтичних агентів, так що терапевтичний агент продукується в ЧКК та/або гемопоетичних стовбурових клітинах таким чином, що зрілі еритроцити на основі цих клітин містять терапевтичний агент.

[0184] Наступні приклади належать до варіантів здійснення даного винаходу в яких нуклеаза містить нуклеазу "цинкових пальців" (ZFN) або TALEN. Слід мати на увазі, що ці приклади тільки для ілюстративних цілей і що можуть бути використані інші нуклеази, наприклад, "хомінг"-ендонуклеази (мегануклеази) з сконструйованими ДНК-зв'язуючими доменами та/або злиття природних сконструйованих "хомінг"-ендонуклеазних (мегануклеазних) ДНК-зв'язуючих доменів і гетерологічних доменів розщеплення та/або системи CRISPR/Cas, що містить сконструйовану одиничну гідову РНК.

Приклади

Приклад 1: Розробка, конструювання і загальна характеристика нуклеаз білків "цинкові пальці" (ZFN)

- [0185] Білки «цинкові пальці» були розроблені і включені в плазмідні, AAV або аденовірусні вектори, в основному, як описано у Urnov et al. (2005) Nature 435(7042):646-651, Perez et al (2008) Nature Biotechnology 26(7):808-816, і як описано в патенті США № 6534261. Для ZFN і TALEN, специфічних для локусу людського бета-глобіну і локусу людського HPRT, див. патент США № 7888121 і патентні публікації США № 20130137104 і 20130122591. Для нуклеаз, специфічних для людського AAVS1, див. патент США № 8110379. Для нуклеаз, специфічних для CCR5, див. патент США № 7951925. Для нуклеаз, специфічних для альбуміну, див. патентні публікації США № 20130177983 і 20139177968.

Приклад 2: Активність глобін-специфічних ZFN

- [0186] Пари ZFN, орієнтовані на локус людського глобіну або регулятори експресії гена бета-подібного глобіну, використали для перевірки здатності цих ZFN індукувати DSB в певному сайті-мішені. Амінокислотні послідовності спіральних ділянок розпізнавання кожного пальця вказаних ZFN наведені в Табл. 1A разом з усіма сайтами-мішенями (сайти-мішені ДНК вказані великими літерами; неконтактні нуклеотиди вказані в нижньому регістрі).

Таблиця 1A

Нуклеази «цинкових пальців»

SBS #,мішень	конструкція					
ZFN, специфічна до людського В-гемоглобіну						
	F1	F2	F3	F4	F5	F6
SBS#33511 <u>ggGCAGTAACGGCA</u> <u>GACttctcctcagg</u> (SEQ ID NO:8)	DRSNLS R (SEQ ID NO:9)	QSSDLR R (SEQ ID NO:10)	RSDTLS A (SEQ ID NO:11)	QSGALA R (SEQ ID NO:12)	QSGDLT R (SEQ ID NO:13)	HE АНАЛІЗУ ВАЛИ
SBS#33533 <u>tgGGGCAAGGTGAA</u> <u>CGTGGAtgaagttg</u> (SEQ ID NO:14)	QSAHRK N (SEQ ID NO:15)	LKHHLTD (SEQ ID NO:16)	QRSNLV R (SEQ ID NO:17)	TSGHLS R (SEQ ID NO:18)	QSNHLT E (SEQ ID NO:19)	RSHHLKA (SEQ ID NO:20)
SBS#35256 <u>agAGTCAGGTGCAC</u> <u>CATggtgtctgttt</u> (SEQ ID NO:21)	TNQNRT (SEQ ID NO:22)	DRSNRT T (SEQ ID NO:23)	PHKSRT R (SEQ ID NO:24)	RSDNLS E (SEQ ID NO:25)	RSQHRK T (SEQ ID NO:26)	HE АНАЛІЗУ ВАЛИ
SBS#35263 <u>gtGGAGAAGTCtGCC</u> <u>GTTactgccctgt(SEQ</u> <u>ID NO:27)</u>	TSGSLS R (SEQ ID NO:28)	DRSDLS R (SEQ ID NO:29)	DRSALA R (SEQ ID NO:30)	QSSNLA R (SEQ ID NO:31)	QSGHLS R (SEQ ID NO:32)	HE АНАЛІЗУ ВАЛИ
SBS#34770 <u>acAGGAGTCAGGTG</u> <u>CACcatggtgtctg(SEQ</u> <u>ID NO:33)</u>	DQSNLR A (SEQ ID NO:34)	PHKSRT R (SEQ ID NO:24)	RSDNLS E (SEQ ID NO:25)	RSQHRK T (SEQ ID NO:26)	RSDHLT Q (SEQ ID NO:35)	HE АНАЛІЗУ ВАЛИ
SBS#34791 <u>gaGAAGTCtGCCGTT</u> <u>ACTgccctgtggg(SEQ</u> <u>ID NO:36)</u>	ARSTRT N (SEQ ID NO:37)	TSGSLS R (SEQ ID NO:28)	DRSDLS R (SEQ ID NO:29)	DRSART R (SEQ ID NO:38)	QSGNLA R (SEQ ID NO:39)	HE АНАЛІЗУ ВАЛИ
SBS#34805 <u>taACGGCAGACtTCT</u> <u>CCAcaggagtcag (SEQ</u> <u>ID NO:40)</u>	QSGDLT R (SEQ ID NO:13)	SSSDRK K (SEQ ID NO:41)	DRSNLS R (SEQ ID NO:9)	QSADRT K (SEQ ID NO:42)	RSDTLA (SEQ ID NO:11)	HE АНАЛІЗУ ВАЛИ
SBS#34826 <u>gcCCTGTGGGGCAA</u> <u>GGTgaacgtggatg(SEQ</u> <u>ID NO:43)</u>	LRHHLT R (SEQ ID NO:44)	QSGNLH V (SEQ ID NO:45)	RSAHLS R (SEQ ID NO:46)	RSDVLST (SEQ ID NO:47)	RKQDLR T (SEQ ID NO:48)	HE АНАЛІЗУ ВАЛИ

Продовження таблиці 1А

SBS#35301 ggGCAGTAACGGCA GACttctcctcagg(<u>SEQ ID NO:8</u>)	DRSNLS R(SEQ ID NO:9)	QSGDLT R(SEQ ID NO:13)	RSDTLS A(SEQ ID NO:11)	QSGALA R(SEQ ID NO:12)	QSGDLT R(SEQ ID NO:13)	HE АНАЛІЗУ ВАЛИ
SBS#35328 tgGGGCAAGGTGAA CGTggatgaagttg(<u>SEQ ID NO:14</u>)	MSHHLR D (SEQ ID NO:49)	QRSNLV R (SEQ ID NO:17)	TSGHLS R (SEQ ID NO:18)	QSNHLT E (SEQ ID NO:19)	RSHHLK A (SEQ ID NO:20)	HE АНАЛІЗУ ВАЛИ
SBS#35497 caCAGGGCAGTAACg GCAGACttctcct(<u>SEQ ID NO:50</u>)	DRSNLS R (SEQ ID NO:9)	QSGDLT R (SEQ ID NO:13)	DRSNLS R (SEQ ID NO:9)	LKHHLTD (SEQ ID NO:16)	DRSHLT R (SEQ ID NO:51)	RSDNLR E (SEQ ID NO:52)
SBS#35506 ggCAAGGTGAACGT GGAtgaagttggtg(<u>SEQ ID NO:53</u>)	QSGHLA R (SEQ ID NO:54)	VSHHLR D (SEQ ID NO:55)	QSGNLA R (SEQ ID NO:39)	LRHHLTR (SEQ ID NO:44)	QSGNLH V (SEQ ID NO:45)	HE АНАЛІЗУ ВАЛИ
бета-глобін IVS.1						
SBS#43545 atCAAGGTTACAAGA CAGGTttaaggag(<u>SEQ ID NO:158</u>)	LRHHLTR (SEQ ID NO:44)	QSGTRK T (SEQ ID NO:153)	RSDNLS T (SEQ ID NO:154)	DSANRIK (SEQ ID NO:155)	LRHHLTR (SEQ ID NO:44)	QSGNLH V (SEQ ID NO:45)
SBS#43544 aaTCTGCCCAGGGC CTCaccaccaactt(<u>SEQ ID NO:159</u>)	AMQTLR V(SEQ ID NO:156)	DRSHLA R(SEQ ID NO:76)	RSDNLS E(SEQ ID NO:25)	ASKTRK N(SEQ ID NO:77)	RNSDRT K(SEQ ID NO:157)	HE АНАЛІЗУ ВАЛИ
ZFN, специфічна до людського BCL11A						
Екзон 2						
SBS#39172 ctCCAGAAGGGGAT CATGACctcctcac(<u>SE Q ID NO:160</u>)	DRSNLS R(SEQ ID NO:9)	LRQNLIM (SEQ ID NO:161)	TSANLTV (SEQ ID NO:162)	RSDHLS R(SEQ ID NO:94)	QSGNLA R(SEQ ID NO:39)	QRNDRK S(SEQ ID NO:163)
SBS#43490 ctCCAGAAGGGGAT CATGACctcctcac(<u>SE Q ID NO:160</u>)	DRSNLS R(SEQ ID NO:9)	LRQNLIM (SEQ ID NO:161)	LQSQLN R(SEQ ID NO:164)	RSDHLS R(SEQ ID NO:94)	QSGNLA R(SEQ ID NO:39)	QRNDRK S(SEQ ID NO:163)
SBS#44642 ctCCAGAAGGGGAT CATGACctcctcac(<u>SE Q ID NO:160</u>)	DRSNLS R(SEQ ID NO:9)	LRQNLIM (SEQ ID NO:161)	LQSQLN R(SEQ ID NO:164)	RSDHLS R(SEQ ID NO:94)	QSGNLA R(SEQ ID NO:39)	QRNDRK S(SEQ ID NO:163)
SBS#45148 ctCCAGAAGGGGAT CATGACctcctcac(<u>SE Q ID NO:160</u>)	DRSNLS R(SEQ ID NO:9)	TSSNRN H(SEQ ID NO:166)	HSGNLT K(SEQ ID NO:167)	RSDHLS R(SEQ ID NO:94)	QSGNLA R(SEQ ID NO:39)	<u>QKVDLS</u> <u>R</u> (SEQ ID NO:168)
SBS#45147 ctCCAGAAGGGGAT CATGACctcctcac(<u>SE Q ID NO:160</u>)	DRSNLS R(SEQ ID NO:9)	TSSNRN H(SEQ ID NO:166)	QANNLK V(SEQ ID NO:169)	RSDHLS R(SEQ ID NO:94)	QSGNLA R(SEQ ID NO:39)	QKVDLS R(SEQ ID NO:168)
SBS#39145 ccCAACGGGCCGTG GTCTGGttcatcat(<u>SEQ ID NO:170</u>)	RSDHLS A(SEQ ID NO:59)	DRSALA R(SEQ ID NO:30)	RSDSLS R(SEQ ID NO:171)	DRSVRT K(SEQ ID NO:172)	RSDHLS A(SEQ ID NO:59)	QRSNLK V(SEQ ID NO:173)
SBS#44490 <u>ccCAACGGGCCGTG</u> <u>GTCTGGttcatcat</u> (<u>SEQ ID NO:170</u>)	RSDHLT Q(SEQ ID NO:35)	DRSALA R(SEQ ID NO:30)	RSDSLS R(SEQ ID NO:171)	DRSVRT K(SEQ ID NO:172)	RSDHLS A(SEQ ID NO:59)	QRSNLK V(SEQ ID NO:173)

Продовження таблиці 1А

SBS#44489 ccCAACGGGCCGTG GTCTGGttcatcat(SEQ ID NO:170)	RSDHLLT (SEQ ID NO:174)	DRSALA R(SEQ ID NO:30)	RSDSLS R(SEQ ID NO:171)	DRSVRT K(SEQ ID NO:172)	RSDHLS A(SEQ ID NO:59)	QRSNLK V(SEQ ID NO:173)
SBS#45081 ccCAACGGGCCGTG GTCTGGttcatcat(SEQ ID NO:170)	RSDHLS A(SEQ ID NO:59)	WATARD R(SEQ ID NO:175)	RSDSLS R(SEQ ID NO:171)	HTKSLSR (SEQ ID NO:176)	RSDHLS A(SEQ ID NO:59)	QRSNLK V(SEQ ID NO:173)
SBS#44493 ccCAACGGGCCGTG GTCTGGttcatcat(SEQ ID NO:170)	RSAHLT Q(SEQ ID NO:177)	DRSVLR R(SEQ ID NO:178)	RSDSLS R(SEQ ID NO:171)	DRSVRT K(SEQ ID NO:172)	RSDHLS A(SEQ ID NO:59)	QRSNLK V(SEQ ID NO:173)
SBS#29527 atCCCATGGAGAGG TGGCTGggaaggac(S EQ ID NO:56)	RSDVLS E(SEQ ID NO:57)	RNQHRK T(SEQ ID NO:58)	RSDHLS A(SEQ ID NO:59)	RSANLT R(SEQ ID NO:60)	RSDVLS N(SEQ ID NO:61)	DRSTRIT(SEQ ID NO:62)
SBS#29528 atATTGCAGACAATA ACccctttaacct(SEQ ID NO:63)	DRSNLS R(SEQ ID NO:9)	HRQHLV T(SEQ ID NO:64)	DRSNLT R(SEQ ID NO:65)	QSGDLT R(SEQ ID NO:13)	HRSSLLN (SEQ ID NO:66)	НЕ АНАЛІЗУ ВАЛИ
SBS# 29525 caTCCCAGGCGTGG GGAttagagctcca(SEQ ID NO:66)	QSGHLS R(SEQ ID NO:32)	RSDHLS T(SEQ ID NO:67)	RSADLS R(SEQ ID NO:68)	RSDNLS Q(SEQ ID NO:69)	ASNDRK K(SEQ ID NO:70)	НЕ АНАЛІЗУ ВАЛИ
SBS#29526 gtGCAGAATATGCCC CGCAGggtatttg(SEQ ID NO:71)	RSDNLS A(SEQ ID NO:72)	RNNDRK T(SEQ ID NO:73)	DRSDLS R(SEQ ID NO:29)	TSSNRT K(SEQ ID NO:74)	QSGNLA R(SEQ ID NO:39)	QSGDLT R(SEQ ID NO:13)
ЕКЗОН 4						
SBS#34678 atATTGCAGACAATA ACccctttaacct(SEQ ID NO:179)	DRSNLS R(SEQ ID NO:9)	HRQHLV T(SEQ ID NO:64)	DRSNLT R(SEQ ID NO:65)	QSGDLT R(SEQ ID NO:13)	HRWLRS N(SEQ ID NO:180)	НЕ АНАЛІЗУ ВАЛИ
SBS#34642 atCCCATGgAGAGGT GGCTGGgaaggac(SE Q ID NO:56)	RSDHLS Q(SEQ ID NO:99)	DSSHRT R(SEQ ID NO:181)	LRHHLTR (SEQ ID NO:44)	QSAHLK A(SEQ ID NO:182)	RSDVLS N(SEQ ID NO:61)	DRSTRIT(SEQ ID NO:62)
Bcl11a-XL						
SBS#44889 ctCACTGTCCACAGG AGaagccacacgg(SEQ ID NO:183)	RSANLA R(SEQ ID NO:184)	RLDNRT A(SEQ ID NO:185)	QSNLDN S(SEQ ID NO:186)	WRSSLK T(SEQ ID NO:187)	DRSNRK T (SEQ ID NO:188)	НЕ АНАЛІЗУ ВАЛИ
SBS#44888 ttGCTACAGTTCTTG AAGACtttccac(SEQ ID NO:189)	DRSNLS R(SEQ ID NO:9)	QSGNLA R(SEQ ID NO:39)	YKHVLS D(SEQ ID NO:190)	TSGSLTR (SEQ ID NO:191)	QSGDLT R (SEQ ID NO:13)	LKDTLRR (SEQ ID NO:192)
SBS#44905* gaGAAGCCACACGG GCGAAAggcttat(SE Q ID NO:193)	QSGNLD S(SEQ ID NO:194)	RSADLS R(SEQ ID NO:68)	RSDHLS E(SEQ ID NO:78)	QNATRIN (SEQ ID NO:195)	WNSDLR K (SEQ ID NO:196)	QSGNLA R(SEQ ID NO:39)
SBS#44904* tgGACAGTGAGATTG CTacagttcttga(SEQ ID NO:197)	QSSDLS R(SEQ ID NO:88)	YKWTLR N(SEQ ID NO:198)	RSANLT R(SEQ ID NO:60)	TSTKLRT (SEQ ID NO:199)	DRSNLT R (SEQ ID NO:65)	НЕ АНАЛІЗУ ВАЛИ

Продовження таблиці 1А

SBS#44911 gcCACACGGGCGAA aGGCCTTataatg(SE Q ID NO:200)	AMQTLR V(SEQ ID NO:156)	DRSHLA R(SEQ ID NO:76)	QRSNLV R(SEQ ID NO:17)	DRSHLA R(SEQ ID NO:76)	RSDLST (SEQ ID NO:201)	DSSNRIN (SEQ ID NO:202)
SBS#44910 ctCCTGTGGACAGTG AGATTgctacagt(SEQ ID NO:203)	NDLFLYL (SEQ ID NO:204)	RSANLTR (SEQ ID NO:60)	TSTKLRT (SEQ ID NO:199)	DRSNLT R(SEQ ID NO:65)	RSDSLSV (SEQ ID NO:205)	HNDSRK N(SEQ ID NO:206)
SBS#44945 aaGCTCACCAGGCA CATGAAaacgcatg(SE Q ID NO:207)	QSGNLA R(SEQ ID NO:39)	CRQNLA N(SEQ ID NO:208)	YQGVLT R(SEQ ID NO:209)	RSDNLR E(SEQ ID NO:52)	DRSNRT T (SEQ ID NO:23)	HRSSLR R(SEQ ID NO:210)
SBS#44944 ctACTCTGgGCACAG GCATAGttgcaca(SEQ ID NO:211)	RSDNLS T(SEQ ID NO:154)	QSSDLR R(SEQ ID NO:10)	RSDALS E(SEQ ID NO:212)	QNATRT K(SEQ ID NO:115)	RSDLSE (SEQ ID NO:84)	ARSTRTN (SEQ ID NO:37)
SBS#44947** ctCACCAGGCACAT GAAACGcatgccc(SE Q ID NO:213)	GSSALT Q(SEQ ID NO:214)	QSGNLA R(SEQ ID NO:39)	TASHLKE (SEQ ID NO:215)	QNATRT K(SEQ ID NO:115)	RSDNLS E (SEQ ID NO:25)	SSRNLAS (SEQ ID NO:216)
SBS#44946** ctACTCTGgGCACAG GCATAGttgcaca(SEQ ID NO:211)	RSDNLS T(SEQ ID NO:154)	QSSDLR R(SEQ ID NO:10)	RSDALS E(SEQ ID NO:212)	QNATRT K(SEQ ID NO:115)	RSDLSE (SEQ ID NO:84)	ARSTRTN (SEQ ID NO:37)
ZFN, специфічна до людського KLF1						
KLF-Екзон 1						
SBS#36004 ggGAAGGGGCCCA GGGCGGTcagtgtgc(SEQ ID NO:75)	TSGHLS R(SEQ ID NO:18)	DRSHLA R(SEQ ID NO:76)	RSDNLS Q(SEQ ID NO:69)	ASNDRK K(SEQ ID NO:70)	RSDHLS E(SEQ ID NO:78)	QSGNLA R(SEQ ID NO:39)
SBS#36021 acACACAGGATGACt tcctcaaggtggg(SEQ ID NO:79)	DRSNLT R(SEQ ID NO:65)	TSANLSR (SEQ ID NO:217)	RSDHLS E(SEQ ID NO:78)	QSASRK N(SEQ ID NO:81)	HE АНАЛІЗУ ВАЛИ	HE АНАЛІЗУ ВАЛИ
SBS#33237 <u>ggGAAGGGGCCCA</u> <u>GGGCGGTcagtgtgc</u> (SEQ ID NO:75)	TSGHLS R (SEQ ID NO:18)	DRSHLA R (SEQ ID NO:76)	RSDNLS E (SEQ ID NO:25)	ASKTRK N (SEQ ID NO:77)	RSDHLS E (SEQ ID NO:78)	QSGNLA R (SEQ ID NO:39)
SBS#33238 acACACAGGATGACt <u>tcctcaaggtggg</u> (SEQ ID NO:79)	DRSNLS R (SEQ ID NO:9)	TSGNLTR (SEQ ID NO:80)	RSDHLS E (SEQ ID NO:78)	QSASRK N (SEQ ID NO:81)	HE АНАЛІЗУ ВАЛИ	HE АНАЛІЗУ ВАЛИ
SBS#33257 <u>cgCCACCGGGCTCC</u> <u>GGGccccgagaagt</u> (SEQ ID NO:82)	RSAHLS R (SEQ ID NO:46)	DSSDRK K (SEQ ID NO:83)	DRSHLA R (SEQ ID NO:76)	RSDLSE (SEQ ID NO:84)	QSGDLT R (SEQ ID NO:13)	HE АНАЛІЗУ ВАЛИ
SBS#33258 <u>ccCCAGACcTGCGC</u> <u>TCTGGCGcccagcg</u> (SEQ ID NO:85)	RSDSLLR (SEQ ID NO:86)	RLDWLP V (SEQ ID NO:87)	QSSDLS R (SEQ ID NO:88)	AASNRS K (SEQ ID NO:89)	DRSNLS R (SEQ ID NO:9)	QSGDLT R (SEQ ID NO:13)
SBS#33269 ggCTCGGgGCCGG GGCTGGAgccaggg (SEQ ID NO:90)	QSSHLT R (SEQ ID NO:91)	QSSDLT R (SEQ ID NO:92)	RSDHLS E (SEQ ID NO:78)	HSRTRT K (SEQ ID NO:93)	RSDHLS R (SEQ ID NO:94)	DRSARN S (SEQ ID NO:95)

Продовження таблиці 1А

SBS#33270 aaGGCGCTGGCGCT gCAACCGgtgtacc (SEQ ID NO:96)	RSDTLSE (SEQ ID NO:84)	QSHNRT K (SEQ ID NO:97)	QSSDLS R (SEQ ID NO:88)	DRSHLA R (SEQ ID NO:76)	QSSDLS R (SEQ ID NO:88)	DRSHLA R (SEQ ID NO:76)
SBS#33271 ttGCAGCGCCAGCG CCTTGgctcgggg (SEQ ID NO:98)	RSDHLS Q (SEQ ID NO:99)	HRSSLG D (SEQ ID NO:100)	RSDDLTL R (SEQ ID NO:101)	QRSTLSS (SEQ ID NO:102)	RSADLTR (SEQ ID NO:103)	QSGDLT R (SEQ ID NO:13)
SBS#33272 <u>cgGTGTACCCGGGG</u> <u>CCCggcgccggctc</u> (SEQ ID NO:104)	DRSDLS R (SEQ ID NO:29)	RSTHLVR (SEQ ID NO:105)	RSDSLST (SEQ ID NO:106)	DSSDRT K (SEQ ID NO:107)	RSAALAR (SEQ ID NO:108)	НЕ АНАЛІЗУ ВАЛИ
KLF-Екзон 2						
SBS#36071 ggTGAGGAGGAGAT CCAggtcccaggtg(SE Q ID NO:218)	NNRDLIN (SEQ ID NO:219)	TSSNLSR (SEQ ID NO:220)	QSGHLS R(SEQ ID NO:32)	QSGHLA R(SEQ ID NO:54)	QRTHLN S(SEQ ID NO:221)	НЕ АНАЛІЗУ ВАЛИ
SBS#36085 ctTCTCGGGCCCGG aGCCCGGtgggcg(S EQ ID NO:222)	RSDHLS E(SEQ ID NO:78)	HSRTRT K(SEQ ID NO:93)	RSDHLS E(SEQ ID NO:78)	HSRTRT K(SEQ ID NO:93)	RSDHLS E(SEQ ID NO:78)	RKSDRIK (SEQ ID NO:223)
ZFN 5' регуляторна ділянка людського гама-глобіну						
регуляторна ділянка (-175)						
SBS#34360 ttGCATTGAGATAGT GTGGGgaaggggc(S EQ ID NO:109)	RSDHLS V(SEQ ID NO:110)	RSDVRK T(SEQ ID NO:111)	RSDYLSK (SEQ ID NO:112)	TSSVRTT (SEQ ID NO:113)	RPYTLRL (SEQ ID NO:114)	QNATRT K(SEQ ID NO:115)
SBS#34363 atCTGTCTGAAACG GTCcctggctaaac(SE Q ID NO:116)	DRSALA R(SEQ ID NO:30)	RRDILHQ (SEQ ID NO:117)	QSGNLA R(SEQ ID NO:39)	LAYDRRK (SEQ ID NO:118)	RSDVLSE (SEQ ID NO:57)	НЕ АНАЛІЗУ ВАЛИ
SBS#34398 ttTGCATTGAGATAG TGtggggaagggg(SEQ ID NO:119)	RSDSLLR (SEQ ID NO:86)	QSCARN V(SEQ ID NO:120)	RSDNLA R(SEQ ID NO:121)	HRNTLLG (SEQ ID NO:122)	MRNRLN R(SEQ ID NO:123)	НЕ АНАЛІЗУ ВАЛИ
SBS#34400 ctGTCTGAaACGGT CcCTGGCTaaactc(S EQ ID NO:124)	QSSDLS R(SEQ ID NO:88)	RRDALL M(SEQ ID NO:125)	DRSALA R(SEQ ID NO:30)	RRDILHQ (SEQ ID NO:117)	QNAHRK T(SEQ ID NO:126)	DRSALAR (SEQ ID NO:30)
SBS#31160 taTTTGCAtTGAGAT AGTGTGgggaagg(S EQ ID NO:127)	RSDSLLR (SEQ ID NO:86)	LQHHLTD (SEQ ID NO:128)	TSGNLTR (SEQ ID NO:80)	TSTHLHI (SEQ ID NO:129)	QSGDLT R(SEQ ID NO:13)	HKWVLR Q(SEQ ID NO:130)
SBS#34365 ctGTCTGAaACGGT CcCTGGCTaaactc(S EQ ID NO:124)	QSSDLS R(SEQ ID NO:88)	RRDALL M(SEQ ID NO:131)	DRSALA R(SEQ ID NO:30)	RRDILHQ (SEQ ID NO:117)	QNAHRK T(SEQ ID NO:126)	DRSALAR (SEQ ID NO:30)
регуляторна ділянка (-110)						
SBS#34539 tgGTCAAGGCAAGG CTGgccaacccatg(SE Q ID NO:224)	RSDVLSE (SEQ ID NO:57)	RNQHRK T(SEQ ID NO:58)	QSGDLT R(SEQ ID NO:13)	RSDHLST (SEQ ID NO:67)	DRSALAR (SEQ ID NO:30)	НЕ АНАЛІЗУ ВАЛИ
SBS#34574 gcCTTGACAAGGCA AACTtgaccaatag(SEQ ID NO:225)	DRSNRT T(SEQ ID NO:23)	QSGSLT R(SEQ ID NO:226)	RSDNLSV (SEQ ID NO:227)	DRSNLS R(SEQ ID NO:9)	LKFALAN (SEQ ID NO:228)	НЕ АНАЛІЗУ ВАЛИ

Продовження таблиці 1А

SBS#43865 gcCTTGACAAGGCA AACttgaccaatag(SEQ ID NO:225)	NPANLTR (SEQ ID NO:229)	QNATRT K(SEQ ID NO:115)	RSDNLSV (SEQ ID NO:227)	DRSNLS R(SEQ ID NO:9)	LKFALAN (SEQ ID NO:228)	HE АНАЛІЗУ ВАЛИ
SBS#43852 tgGTCAAGGCAAGG CTGgccaacccatg(SE Q ID NO:224)	RSDVLSE (SEQ ID NO:57)	RNQHRK T(SEQ ID NO:58)	QSGDLT R(SEQ ID NO:13)	RSDNLST (SEQ ID NO:154)	DSSARK K(SEQ ID NO:230)	HE АНАЛІЗУ ВАЛИ

Примітка: BCL11A XL-специфічні пари ZFN, позначені однією зірочкою (*) або двома зірочками (**), містять нові лінкери L7a і L8p, відповідно. Див. Приклад 6.

5

[0187] Аналіз Cel-I (Surveyor™, Transgenomics), як описано у Perez et al. (2008) Nat. Biotechnol. 26: 808-816 і Guschin et al. (2010) Methods Mol Biol. 649:247-56), був використаний для виявлення ZFN-індукованих модифікацій гена-мішені в K562 або HSC. В цьому аналізі, PCR-ампліфікація сайту-мішені супроводжувалась кількісною оцінкою вставок і делецій (інсерційно-делеційні мутації) з використанням ферменту Cel-I, виявляючого помилки (Yang et al. (2000) Biochemistry 39: 3533-3541), який забезпечує оцінку нижньої межі частоти DSB. Через три дні після трансфекції вектору експресії ZFN за стандартних умов (37 °C) або з використанням гіпотермічного шоку (30 °C, див. патентну публікацію США № 20110041195), виділили геномну ДНК з клітин K562, використовуючи набір DNeasy (Qiagen).

10

[0188] Результати аналізу Cel-I демонструють, що ZFN були здатні індукувати розщеплення в їх відповідних сайтах-мішенях (див. також, попередню патентну заявку США № 61/556691). Результати продемонстровані На Фіг. 1 і показують, що активні білки були знайдені у більшості локусів-мішеней в гені бета-глобіну.

15

Приклад 3: Редагування бета-глобінового локусу

20

[0189] ZFN, специфічні до гена людського бета-глобіну (HBB) (Табл. 1), були використані для введення донорської ДНК в бета-глобіновий локус наступним чином. Донорська ДНК була розроблена таким чином, що послідовність, що кодує HBB генні послідовності, фланкувалась послідовностями, які були гомологічними (гомологічні плечі) ділянці, що оточує сайт розщеплення ZFN в бета-глобіновому гені. Гомологічні плечі складають приблизно 500-600 пар основ в довжину. Донорська послідовність HBB не має будь-яких некодуючих послідовностей, так що при вставці в бета-глобіновий сайт-мішень експресія донора регулюється бета-глобіновим промотором і будь-якими іншими бета-глобіновими регуляторними послідовностями. При вставці HBB-донор зливається в рамці з ендегенними глобіновими послідовностями і дає злитий білок. Крім того, HBB-олігодонор був розроблений для захоплення в розщепленому HBB-гені після обробки ZFN. Оліго містив сайт рестрикції, так що після вставки оліго був введений новий сайт рестрикції в HBB-ген, який згодом можна розщепити.

25

[0190] Як показано На Фіг. 2A, β-глобіновий олігодонор був вставлений в належний локус, як перевірено наявністю нового сайту рестрикції, присутнього на донорській ДНК. Крім того, як показано на Фіг. 2B, аналіз Cel-I продемонстрував, що декілька пар ZFN були здатні розщеплювати ДНК, хоча оліго був присутнім тільки в зразку на смузі 8.

35

[0191] Застосовували методи диференціювання трансгенних клітин CD34+ в зрілі ЧКК, відомі з рівня техніки. Наприклад, клітини СКХ CD34+ очищували за допомогою фікол-паку (GE Healthcare) і мікросфер CD34+ (Miltenyi Biotec) згідно до інструкцій виробника. Клітини CD34+ культивували в середовищі Дульбекко, модифікованому згідно до способу Ісков, з ВІТ 95000 (StemCell Technologies) в присутності факторів росту. Клітини диференціювали в еритроїдну клітинну лінію з використанням моделі 2-фазної рідкої культури. Протягом перших 6 днів (перша фаза), клітини CD34+ вирощували з SCF (100 нг/мл), Flt3-L (100 нг/мл) і IL-3 (20 нг/мл). Вирощені клітини потім комітували і диференціювали в еритроїдну клітинну лінію (друга фаза) з Еро (2 Од/мл) та SCF (50 нг/мл). Див. Giarratana et al. (2011) Blood 118(19):5071-9.

40

Приклад 4: Генна корекція мутації в бета-глобіні.

[0192] Для коригування серпоподібно-клітинних мутацій в гені серпоподібного бета-глобіну був здійснений дволанцюговий розрив в бета-глобіновому локусі за допомогою ZFN з наступним відновленням ДНК, з використанням екзогенного коригуючого олігонуклеотиду як матриці ("олігодонор"). Щоб уникнути вірогідності нуклеаз, які розщеплюють виправлений ген глобіну (ген, в якому олігодонор спрямовує коригування серпоподібної мутації в ендегенному гені HBB),

50

був розроблений олігодонор для сумісної вставки трансляційно мовчазних мутацій в кодуєчу послідовність HBB таким чином, щоб відкоригованим алелям не вистачало однієї з послідовностей-мішеней ZFN. Таким чином, спостерігалось збільшення частоти відкоригованих алелей цільових генів. Для оптимального олігонуклеотидного донору були досліджені деякі

5 мутації в послідовності-мішені ZFN, а також довжина гомологічних плеч.
[0193] Нижче показана послідовність, що оточує серпоподібну мутацію, а різні мутації позначені цифрами. Таким чином, мутація 1 = G на A, мутація 2 = G на A, мутація 3 = TCT на AGC, мутація 4 = C на T і мутація 5 = T на G. Були одержані олігонуклеотиди, які містили різні комбінації мутацій. Послідовність дикого типу ("wt") вказана зверху (SEQ ID NO:231), а

10 послідовність з мутаціями ("mut") вказана нижче (SEQ ID NO:232).
[0194] Сайти-мішені для нуклеаз ("target") вказані жирною лінією, а сайт серпоподібної мутації взятий в бокс. Олігонуклеотиди позначені відповідно мутаціям, таким чином, наприклад, олігонуклеотид SMS1 має тільки сайт 1 мовчазної мутації, тоді як SMS 124 має сайти 1, 2 і 4 мовчазних мутацій

```

target
ACCATGGTGCACCTGACTCCTGAGGAGAAGTCTGCCGTT wt
ACCATGGTGCATCTGACTCCTGAGGAAAAAAGCGCTGTG mut
                1 2 3 4 5

```

15 [0195] Різні оліго були доставлені в клітини CD34+ у вигляді одноланцюгових молекул як «смыслові» або прямі ланцюги (позначається як 'F') або «антисмыслові» або зворотні ланцюги (позначається як 'R'). Оліго доставляються шляхом трансфекції за допомогою пристрою Square Wave BTX ECM 830 за наявності або без нуклеаз. Якщо не вказане інше, то доставляється 3 мкг

20 нуклеаз. Генне редагування було виміряне за допомогою високоефективного секвенування ДНК ампліконів PCR гена HBB. Відсоток генної модифікації визначали шляхом негомологічного з'єднання кінців ("NHEJ", спричинене зшиванням дволанцюгового розриву в ДНК після ZFN-індукованого розщеплення) або спрямованої інтеграції оліго після розщеплення ZFN ("генна корекція") (див. Фіг. 9). Результати вказують, що деякі комбінації мутацій були здатні

25 підвищувати генне коригування в клітинах таким чином, що до 20 % клітин демонстрували генне коригування в серпоподібному локусі.

[0196] Для дослідження впливу довжини гомологічних плеч на відсоток генної корекції були використані оліго SMS12 і SMS124 з 41 і 46 нуклеотидами (88 п.о. олігодонору) або 50 і 50 нуклеотидами гомології (101 п.о. олігодонору) з кожного боку сайту серпоподібної мутації. Результати (див. Фіг. 10) вказують на те, що більш довгі гомологічні плечі були більш ефективними з точки зору спричинення генної корекції у до 40 % алелей, включаючи зміни, визначені за допомогою оліго. Використані оліго показані нижче:

35 SMS124, 88 п.о., R (SEQ ID NO:233):
5'CGTTCACCTTGCCCCACAGGGCAGTAACAGCAGATTTTTCCTCAGGAGTCAGGTGCACCAT
GGTGTCTGTTTGAGGTTGCTAGTGAAC

40 SMS12, 88 п.о., R (SEQ ID NO:234):
5'CGTTCACCTTGCCCCACAGGGCAGTAACGGCAGATTTTTCCTCAGGAGTCAGGTGCACCAT
GGTGTCTGTTTGAGGTTGCTAGTGAAC

45 SMS124, 101 п.о., R (SEQ ID NO:235):
5'CTTCATCCACGTTACCTTGCCCCACAGGGCAGTAACAGCAGATTTTTCCTCAGGAGTCAG
GTGCACCATGGTGTCTGTTTGAGGTTGCTAGTGAACACAG

50 [0197] Для дослідження диференційної здатності і довготривалості генної корекції під час диференціювання клітин CD34+, пули ZFN-модифікованих клітин CD34+ спонукали диференціювати, використовуючи метилцелюлозне середовище Methocult Stemcell Technologies' згідно з інструкціями виробника. Диференціювання аналізували за допомогою аналізу типу колоній, що виникали внаслідок диференціювання, спричиненого Methocult: колонієутворюючі одиниці, еритроїд ("CFU-E"); бурстоутворюючі одиниці, еритроїд ("BFU-E"); колонієутворюючі одиниці, гранулоцит/макрофаг ("CFU-GM") і колонієутворюючі одиниці; гранулоцит/еритроцит/моноцит/макрофаг ("CFU-GEMM"). Результати вказують на те, що ZFN-оброблені клітини зберігають таку саму здатність до диференціювання, що і удавано

55 трансфіковані клітини. Індивідуальні колонії BFU-E були зібрані з чашки і генотиповані з приводу

HBB. Результати вказують на те, що ZFN-індуковані модифікації зберігались протягом диференціювання колоній (див. Фіг. 11). Крім того, частота модифікованих BFU-E колоній була подібна частоті модифікованих алелей в стартовому пулі, демонструючи, що не спостерігається зміщення відносно відредагованих клітин під час утворення BFU-E. Більше того, клітинна

популяція в цілому була досліджена з приводу генної модифікації протягом курсу рідкої культури *in vitro* диференціювання червоних клітин крові. Модифікації були стабільними протягом, принаймні, 18 днів процесу диференціювання червоних клітин крові (див. Фіг. 12).

[0198] Інша загальна мутація в бета-глобіновому гені, яка асоціюється з бета-таласемією, відома як IVS1.1. ця G->A мутація локалізується в межах першої пари основ інтрону 1 бета-глобінового гена, а її наявність в гені призводить до патологічного сплайсингу бета-глобінової пре-мРНА. Таким чином, була сконструйована пара ZFN для розпізнавання і розщеплення ділянки, суттєво рекапітуюча цю мутацію з модельною метою. Тестування цих ZFN виявило, що вони здатні розщеплювати сайт на бета-глобіновому гені, приводячи до 52,63 % NHEJ в клітинах CD34+.

Приклад 5: Вставка бета-глобінового донору в локус «затишної гавані»

[0199] Для вставки бета-глобінового гена дикого типу в локус «затишної гавані» таким чином, щоб експресія з трансгена коригувала дефіцит бета-глобіну в HSC, нуклеази, специфічні до цього локусу «затишної гавані», вводяться в клітину разом з донорською нуклеїновою кислотою. Нуклеази, специфічні до HPRT (див. патентні публікації США № 20130137104 і 20130122591), AAVS1 (див. патент США 8110379), CCR5 (див. патент США 7951925) або бета-глобіну (див. Табл. 1A) вводяться в одержані від пацієнта стовбурові клітини CD34+. Введення може здійснюватись будь-яким методом, відомим з рівня техніки, таким як електропорація мРНК. Розробляється донорська ДНК, що містить трансген, бета-глобін дикого типу і ділянки гомології, фланкуючі трансген, з достатньою гомологією з ділянкою, що оточує «затишну гавань»-мішень, щоб дозволити HDR (як правило, 500 п.о. з кожного боку). Як альтернатива, донорський конструкт, передбачений таким чином, що він не має або містить ділянки гомології, вводиться в ZFN або TALEN-намічений локус шляхом захоплення кінців (див. попередню заявку США № 13/889162). Донор сумісно вводиться в клітину CD34+ перед, під час або після введення ZFN. Модифіковані клітини CD34+ повторно вводяться пацієнту, а потім приживляються, продукують бета-гемоглобін при достатніх рівнях для забезпечення терапевтично релевантної кількості гемоглобіну, який буде продукуватись.

Приклад 6: Інактивація BCL11A і KLF1

[0200] Нуклеази, специфічні до BCL11A і KLF1 (наприклад, ZFN, як показано в Табл. 1A), вводили в HSC, як описано вище, щоб спричинити регуляцію гама-глобінової експресії (див. Фіг. 3), а геном клітин аналізували за допомогою аналізу Cel, як описано вище (Perez et al (2008), там же).

[0201] Як показано на Фіг. 4, після обробки HSC вказаними KLF1-специфічними ZFN, ZFN успішно модифікували локус KLF1 (Фіг. 4C і 4D). Аналогічно, BCL11A-специфічні ZFN модифікували локус BCL11A (Фіг. 4A). Пара ZFN, спрямовано діюча на локус HPRT (див. попередню заявку США № 61/552309), була використана як контроль і також продемонструвала успішне розщеплення (Фіг. 4B). Порівняння сигналу в день 3 після CD34+ клітинної трансдукції з днем 17 диференціювання культури (Фіг. 4E) продемонструвало, що відсоток генетичного редагування (% NHEJ) є стабільним в часі. В кожному гелі, показаному на Фіг. 4E, смуги з відсутньою ідентифікацією слугують негативним контролем.

[0202] Також були перевірені додаткові пари ZFN, спрямовано діючі на екзон 2 або екзон 4 BCL11A. Для цих досліджень, кандидатні пари ZFN вводили в клітини K562 за допомогою Атаха, як описано вище, або вводили в клітини CD34+. Для трансдукції CD34+ був застосований пристрій BTX ECM830 з кюветою з 2 мм зазором. мРНК з клітин отримували із застосуванням mMessageMachine T7 Ultra Kit (# AM1345, Ambion). Людські клітини CD34+ вирощували в середовищі x-vivo10 (Lonza) з 1xCC110 (Stem cell Technology) в планшетах, оброблених нетканинною культурою. Клітини підраховували і збирали центрифугуванням при 1200 обертах на хвилину протягом 10 хвилин при кімнатній температурі. Клітини промивали 1-2 рази в PBS при кімнатній температурі. 200000 клітин були використані для кожної трансфекції, їх ресуспендували в 100 мкл розчину BTEexpress. Додавали по 2-4 мкг мРНК на трансфекцію, і суміш переносили в кювету. Одразу ж після передачі суміш піддавали електропорації в 250 вольт протягом 5 мс. Попередньо підігріте середовище додавали в кювету і середовище плюс клітини переносили в 48-лункові планшети, оброблені нетканинною культурою, а потім інкубували при 37 °C.

[0203] Після певної кількості днів, клітини повторно піддавались геномному аналізу із застосуванням Illumina MiSeq. Для кількісного визначення відсотка відредагованих алелей,

цільову геномну ділянку піддавали PCR-ампліфікації із застосуванням праймерів, які додають стандартні Illumina секвенуючі адаптерні послідовності. Другу групу з 13 раундів PCR проводили, щоб додати штрих-код і адаптерні місткові послідовності до обох кінців. Секвенування проводили на Illumina MiSeq у відповідності до протоколів виробника для секвенування ампліконів. MiSeq генерує з'єднані парнокінцеві зчитувані фрагменти і підігнаний адаптер із застосуванням стандартного програмного забезпечення для вирівнювання. Зчитувані фрагменти потім демультіплексуються зразком за допомогою пари послідовностей штрих-кодів із застосуванням звичайних сценаріїв. Послідовності ампліконів потім повсюдно вирівнювали з еталонною послідовністю за допомогою використання алгоритму Needleman-Wunsch (Needleman, Saul B.; i Wunsch, Christian D. (1970). Jour Mol Bio 48 (3): 443–53). Пробіли або вставки у вирівнюванні рахували як % NHEJ подій і порівнювали з необробленою контрольною послідовністю для визначення швидкості підрахунку послідовностей-специфічного фону.

[0204] Для розрахунку спрямованої інтеграції послідовності ампліконів були вирівняні по всій довжині з еталонною послідовністю за допомогою «біопітонного» використання алгоритму Needleman-Wunsch (Needleman, Saul B.; i Wunsch, Christian D. там же). Зміни послідовностей, одержані за допомогою експериментальних обробок, були прошукані, підраховані і порівняні з підрахунками в контрольних зразках. Відомі одноознакові поліморфізми (SFP) можуть маскуватись під час цього процесу і виключатись з подальшого підрахунку (наприклад, 1-п.о. видалення SFP, близьких до сайту-мішені ZFN). Відсоток NHEJ (також згадується як інсерційно-делеційна мутація) розраховували шляхом визначення відсоткової частини послідовностей, які містять вставки або делеції. Зразки, оброблені тільки вектором GFP, були використані для оцінки PCR і помилок послідовності на базі фонові частоти вставок і делецій. Спостерігались фонові частоти, що складають менше 1 %.

[0205] Набір репрезентативних даних показаний нижче в Табл. 1B, і демонструє, що ці нуклеазні білки приймають активну участь в розщепленні своїх мішеней. Крім того, експресія гама-глобіну контролювалась в деяких клітинах, оброблених нуклеазою. Щоб виконати цей аналіз застосовували RT-qPCR в режимі реального часу ("Taqman") як стандартну процедуру (див. нижче). Результати набору репрезентативних даних відображаються як кратність підвищення експресії гама-глобіну у порівнянні з контрольними клітинами, обробленими GFP. Значення гама розраховували як відношення гама-глобіну до альфа-глобіну, так що будь-який спостережуваний ріст, показаний нижче, являє собою збільшення співвідношення гама до альфа в клітинах, оброблених нуклеазою, у порівнянні з співвідношенням гама до альфа в клітинах, оброблених вектором GFP.

Таблиця 1B

Активність BCL11A екзону 2 і екзону 4 пар ZFN

Мішень	Пара ZFN	% інсерційно-делеційних мутацій, K562	% інсерційно-делеційних мутацій, CD34+	Кратність збільшення мРНК
Екзон 2	39145/39172		69,78	3,65X
	39145/43490	19,88		nd
	39145/44642	38,52		nd
	39145/41548	42,26		nd
	39145/41547	35,63		nd
	44490/39172	29,38		nd
	44489/39172	24,34		nd
	45081/39172	27,80		nd
	44493/39172	25,68		nd
Екзон 4	34678/34642		82,24	3,52X

[0206] TALEN були також зроблені як для ділянки екзону 2, так і для ділянки екзону 4 BCL11A. TALEN були сконструйовані, як описано вище, за допомогою канонічного коду TALE і скелету '17' TALEN (див. патентну публікацію № 20110301073). Табл. 1C показує послідовність-мішень для TALEN, а також послідовність RVD в ДНК-зв'язуючому домені.

пари TALEN проти BCL11A

Номер SBS (екзон)	Послідовність-мішень 5'→3'	Послідовність RVD (N→C)
101291 (екзон 2)	ctGTGGGGCAGTGCCAGATga (SEQ ID NO:236)	NN-NG-NN-NN-NN-HD-NI-NN-NG-NN-HD- HD-NI-NN-NI-NG (SEQ ID NO:237)
101292 (екзон 2)	ctCGATAAAAATAAGAATgt (SEQ ID NO:238)	HD-NN-NI-NG-NI-NI-NI-NI-NG-NI-NI-NN- NI-NI-NG(SEQ ID NO:239)
101301 (екзон 4)	atGTCCTTCCCAGCCACCTct (SEQ ID NO:240)	NN-NG-HD-HD-NG-NG-HD-HD-HD-NI-NN- HD-HD-NI-HD-HD-NG(SEQ ID NO:241)
101304 (екзон 4)	gtTAAAGGGGTTATTGTct (SEQ ID NO:242)	NG-NI-NI-NI-NN-NN-NN-NN-NG-NG-NI-NG- NG-NN-NG(SEQ ID NO:243)

[0207] Пари TALEN, показані вище, були введені в клітини і продемонстрували розщеплюючу активність. Пара 101291/101292 дала 0,8 % інсерційно-делеційних мутацій, як виміряно за допомогою аналізу Cel-1 в клітинах K562. Пара TALEN 101301/101304 дала 35,7 % інсерційно-делеційних мутацій в клітинах CD34+, і була виявлена за допомогою аналізу RT-PCR, описаного вище, щоб спричинити підвищення експресії гама-глобінової мРНК приблизно в 2,31 рази.

[0208] Пари ZFN також були одержані для спрямованої дії на частину 'XL' в сплайс-варіанті BCL11A-XL. Ці білки перевірялись на клітинах K562, набір репрезентативних даних показаний нижче в Табл. 1D. Ізоформа 'XL' BCL11A містить 3 додаткових природних «цинкових пальці» (пальці 4-6), таким чином, підхід включав руйнування гена BCL11A в цій ділянці, щоб спричинити розгортання потенційно «цинкових пальців» 4, 5 та/або 6 і їх комбінацій (номери від 1 до 3 в ділянці XL). Також ZFN були розроблені, щоб уникнути розщеплення спорідненої генної послідовності BCL11B. Одна пара ZFN, 44888/44889, спрямована на четвертий «цинковий палець» BCL11A, тоді як дві пари, 44904/44905 і 44910/44911, спрямовані вгору на четвертий палець (номер 1 в ділянці XL), а дві інші пари, 44946/44947 і 44945/44944, спрямовані на п'ятий палець (номер 2 в ділянці XL). Ці білки перевіряли на клітинах K562, набір репрезентативних даних показаний нижче в Табл. 1D. Дві з пар ZFN містили нові лінкерні послідовності між ДНК-зв'язуючим доменом ZFP і нуклеазним доменом FokI. Пара 44904/44905 містила лінкерну послідовність L7a (див. патентну заявку США № 20090305419), а пара 44946/44947 містила лінкерну послідовність L8p, обидві наведені нижче. Див. також попередню заявку США № 61/871219:

L7a: HTKIHLRGSQVLVKSSEAAAR(SEQ ID NO:244)

L8p: HTKIHLRGSYAPMPPLALASP (SEQ ID NO:245).

Таблиця 1D

Активність пар ZFN, специфічних до XL BCL11A

Пара ZFN	% інсерційно-делеційних мутацій, K562
44889/44888	35,14
44905/44904	25,45
44911/44910	36,43
44945/44944	24,03
44947/44946	34,22

[0209] Пари XL BCL11A, перевірені на клітинах CD34+, є активними. Вимірювання експресії гама-глобіну показує, що модифікація XL BCL11A приводить до збільшення експресії гама-глобіну відносно альфа-глобіну.

[0210] Додаткові пари KLF1-специфічних ZFN були перевірені з приводу активності в клітинах CD34+, а ці клітини були проаналізовані з приводу будь-яких змін в експресії гама-глобіну. Набір репрезентативних даних показаний нижче в Табл. 1E.

Таблиця 1Е

Активність KLF-специфічних пар ZFN

мішень	Пара ZFN	% інсерційно-делеційних мутацій, CD34+	Кратність збільшення гама мРНК
KLF екзон 1	36004/36021	44,4	2,2X
KLF екзон 2	36071/36085	22,6	3,17X

[0211] Співвідношення мРНК, що кодують γ -глобін і β -глобін, після обробки BCL11A- або KLF1-специфічними нуклеазами в HSC визначали в різні моменти часу до 17 днів після введення ZFN за допомогою аналізу Taqman, а рівні мРНК бетаподібного глобіну також нормували до рівня 18S рРНК. Рівні експресії гама-глобіну підвищувались в тих клітинах, які були оброблені BCL11A- або KLF1-специфічними нуклеазами (Фіг. 5). Аналіз проводився згідно зі стандартним аналізом Taqman згідно протоколу та із застосуванням геноспецифічних аналізів, що постачаються виробником (Applied Biosystems).

[0212] BCL11A ZFN-модифіковані клітини також аналізувались для визначення співвідношення γ/β мРНК як між клітинними популяціями, в яких одна алель була модифікована за допомогою ZFN ("Bb"), так і клітинами, в яких обидві алелі були модифіковані за допомогою ZFN ("нокаутовані"), і диким типом ("BB").

[0213] Як показано на Фіг. 6, співвідношення γ/β мРНК відрізняється між клітинами, в яких нокаут BCL11A зустрічається тільки в одній алелі (Bb, смуги 6-10 зліва) або коли нокаут обидві алелі (нокаут, крайні справа 5 смуг, смуги 11-15 зліва), і обидва пули клітин відрізнялись від дикого типу (BB, перші 5 смуг).

Приклад 7: Модифікація регуляторної ділянки гена гама-глобіну

[0214] При іншому підході, щоб збільшити експресію гама-глобіну, мутації були здійснені в регуляторній ділянці гена гама-глобіну, щоб імітувати мутації СПФГ (див. Фіг. 9). Нижче показана ділянка від -202 до -102 відносно ATG в гені гама-глобіну. На цій послідовності сірі бокси вказують ділянки, які були показані, щоб зв'язуватись з СПФГ, а підкреслена послідовність, яка при видаленні також була зв'язана з СПФГ (див. A Syllabus of Thalassemia Mutations (1997) by Titus H.J. Huisman, Marianne F.H. Carver, i Erol Baysal, опублікована The Sickle Cell Anemia Foundation in Augusta, GA, USA. Copyright © 1997 by Titus H.J. Huisman):

-202
CCCTTCCCCACACTATCTCAATGCAAATATGTCTCTGAAACGGTCCCTGGCTAAACTCCACCC
ATGGGTT

GGCCTTGCCTTGACCAATAGCCTTGAC(SEQ ID NO:132)

-102
[0215] Нуклеази були розроблені, як описано в Прикладі 1 і показано в Табл. 1А, щоб зв'язуватись в ділянці цих СПФГ-асоційованих мутацій і індукувати мутації в ділянці дикого типу. Відсоток відредагованих алелей, визначений (% NHEJ) в клітинах K562 за допомогою аналізу Cel I (див. Perez et al (2008), там же), показаний нижче в Табл. 2. Крім того, деякі пари були випробувані в клітинах CD34+, як описано вище, і проаналізовані за допомогою секвенування MiSeq, як описано вище. Для деяких пар, клітини аналізували з приводу будь-якої зміни в експресії гама-глобіну. В Табл. 2 нижче показані репрезентативні набори даних.

Таблиця 2

Редагування пар ZFN, специфічних до гама-глобіну

Пара ZFN (локалізація)	% NHEJ K562	% NHEJ CD34+	Кратність збільшення гама мРНК
34360/34363 (-175)	39		
34398/34400 (-175)	54		
31160/34365 (-175)	53	45,22	1,63X
34539/34574 (-110)		45,71	5,38X
43865/43852 (-110)		56,13	

Перші три пари, перевірені в цьому аналізі, спрямовано діяли на ділянку біля -175 в гама-промоторній ділянці, в той час як дві останні спрямовано діяли на ділянку -110 в гама-

глобіновому промоторі.

[0216] Гама-промоторну ділянку в клітинах K562, яка була відредагована, секвенували для аналізу утворених мутацій. Ділянку спочатку PCR-ампліфікували, а потім PCR-продукти секвенували, спостерігалось декілька різних мутацій, в тому числі делецій і вставок (Фіг. 8). В цьому експерименті, 42% алелей мутували, а 20 % несло 13 п.о. делецій від -114 до -102, асоційованих з СПФГ.

[0217] Дві пари ZFN, спрямованих на гама-глобіновий промотор, також були використані для обробки клітин в комбінації з олігонуклеотидним донором, розробленим для відновлення найбільш розповсюджених мутацій у суб'єкта з СПФГ. Той самий протокол, описаний вище для використання з пристроєм ВТХ, був здійснений з додаванням 3 мкл 100 мкМ розчину донорського олігонуклеотиду. Послідовність олігонуклеотидних донорів показана нижче. Як правило, в цих експериментах застосовували прямий олігонуклеотидний донор, але й зворотний працював добре:

HBG_d13 прямий:

acactatctcaatgcaaatatctgtctgaaacgggtccctggctaaactccaccatgggtggccagccttccttgacaaggcaaaacttgacca
atagtcttagagtatccagtgaggccagg (124mer, SEQ ID NO:246)

HBG_d13 зворотний:

cctggcctcactggatactctaagactattgggtcaagtttgctgtgaaggcaaggctggccaaccatgggtggagttagccaggggac
cgtttcagacagatattgcattgagatagtgt (124mer, SEQ ID NO:247)

[0218] Для пари ZFN 34539/34574 в присутності донору, продукування мРНК з гама-глобінового гена підвищується в 6,38 разів у порівнянні з клітинами, обробленими вектором GFP, тоді як для пари ZFN 31160/34365, гама мРНК підвищується в 6,13 разів у порівнянні з клітинами, обробленими вектором GFP.

[0219] Оброблені нуклеазами HSC висівали на метилцелюлозу. Після генотипування індивідуальних колоній за допомогою PCR-секвенування вимірювали рівні мРНК для гама-глобіну, бета-глобіну і 18S рРНК, контролю для дикого типу, а мутантні колонії – за допомогою RT-PCR. (Фіг. 8). В середньому, гама-глобінові промоторні мутанти мали більш високе співвідношення гама-глобінових мРНК до бета-глобінових мРНК, ніж клітини дикого типу, а корекція з боку сигналу 18s рРНК показує, що збільшення співвідношення гама-глобіну/бета-глобіну в мутантних колоніях спричинене підвищенням рівнів гама-глобінової мРНК в цих колоніях, а не зниженням рівнів бета-глобінової мРНК.

Приклад 8: Нуклеази TALE, спрямовано діючі на гама-глобіновий промотор

[0220] Нуклеази TALE також були одержані для спрямованої дії на ділянку -200 або ділянку -110 (описані вище) промоторної ділянки гама-глобіну. TALEN були сконструйовані, як описано вище, за допомогою канонічного коду TALE і скелету '17' TALEN (див. патентну публікацію № 20110301073).

Таблиця 3

TALEN, специфічні до гама-глобінового промотору

номер SBS	послідовність 5'→3'	Послідовність RVD (N→C)
102314	gtATCCTCTTGGGGG cc (SEQ ID NO:133)	NI-NG-HD-HD-NG-HD-NG-NG-NN-NN-NN-NN-NK (SEQ ID NO:134)
102318	atATTTGCATTGAGA TAGTgt (SEQ ID NO:135)	NI-NG-NG-NG-NN-HD-NI-NG-NG-NN-NI-NN-NI-NG-NI- NN-NG (SEQ ID NO:136)
102315	gtATCCTCTTGGGGG Ccc (SEQ ID NO:133)	NI-NG-HD-HD-NG-HD-NG-NG-NN-NN-NN-NN-NN-HD (SEQ ID NO:137)
102320	atATTTGCATTGAGA TAgt (SEQ ID NO:135)	NI-NG-NG-NG-NN-HD-NI-NG-NG-NN-NI-NN-NI-NG-NI (SEQ ID NO:136)
102316	gtATCCTCTTGGGGG CCcc (SEQ ID NO:133)	NI-NG-HD-HD-NG-HD-NG-NG-NN-NN-NN-NN-NN-HD- HD (SEQ ID NO:138)

Продовження таблиці 3

102321	atATTTGCATTGAGA Tag (SEQ ID NO:135)	NI-NG-NG-NG-NN-HD-NI-NG-NG-NN-NI-NN-NI-NG (SEQ ID NO:139)
102566 (-110)	gtTGGCCAGCCTTGC CTTGac(SEQ ID NO:248)	NG-NN-NN-HD-HD-NI-NN-HD-HD-NG-NG-NN-HD-HD- NG-NG-NK(SEQ ID NO:249)
102568 (-110)	ttGGTCAAGTTTGCC TTGTca (SEQ ID NO:250)	NN-NN-NG-HD-NI-NI-NN-NG-NG-NG-NN-HD-HD-NG- NG-NN-NG (SEQ ID NO:251)

[0221] TALEN потім застосовувались в парах для тестування розщеплення в клітинах K562 і аналізувались за допомогою аналізу Cel 1, як описано вище, а результати пар показані нижче в Табл. 4. Крім того, пара TALEN 102566/102568 тестувалась проти клітин CD34+ і виявила 51,39 % NHEJ, як виміряно в аналізі MiSeq.

[0222] Дві пари TALEN також тестувались з приводу експресії гама-глобінової мРНК, вимірної у вигляді співвідношення гама-глобінової мРНК до альфа-глобінової мРНК. Пара 102566/102568 збільшувала гама-глобінову експресію в 6,25 разів у порівнянні з клітинами CD34+, обробленими вектором GFP, а пара 102318/102314 збільшувала гама-глобін в 2,14 рази у порівнянні з клітинами CD34+, обробленими вектором GFP. Пару 102566/102568 також перевіряли з олігодонором, описаним вище, причому було виявлено, що одержані клітини підвищували гама-глобінову експресію в 9,13 разів у порівнянні з клітинами CD34+, обробленими вектором GFP.

Таблиця 4

Редагування ділянки гама-глобінового промотору за допомогою TALEN

Пара TALEN	% NHEJ '+17'
102314:102318	41,6
102315:102320	47,9
102316:102321	46,6

Приклад 9: Гама-глобінове редагування в стовбурових клітинах CD34+

[0223] Нуклеази, специфічні до гама-глобінової промоторної ділянки, потім застосовували в клітинах CD34+, одержаних від пацієнта. Клітини обробляли нуклеазами, а потім аналізували з приводу успішного редагування за допомогою аналізу Cel 1. Клітини додатково були проаналізовані з приводу співвідношення гама-глобіну до бета-глобіну і демонстрували підвищену експресію гама-глобіну. Репрезентативні дані, виявлені для підвищеної експресії гама-глобіну, знаходяться в експериментальних параграфах для різних підходів вище.

Приклад 10: Редагований енграфтмент CD34+ у мишей

[0224] Оброблені нуклеазами клітини CD34+ (людські стовбурові клітини-попередники HSPC) зберегли здатність приживлятися у мишей NOD/SCID/IL2 гама(нуль) і приводити до виникнення поліклонального мультилінійного потомства, у якого гени, що беруть участь в регуляції гама-глобіну, постійно руйнуються (див. Holt et al, (2010) Nat Biotechnol. Aug;28(8):839-47). Аналогічно, CD34+ або HSPC, редаговані в локусі бета-глобіну, де мутація скоригована, або донорський бета-глобіновий ген вставлений в локус «затишної гавані», або які оброблені нуклеазами, щоб змінити експресію гама-глобіну, здатні приводити до мультилінійного потомства, що несе бажане геномне редагування. Демонстрація того, що меншість відредагованих HSPC може заповнити відредаговане потомство тварини підтверджує використання нуклеазомодифікованих аутологічних гемопоетичних стовбурових клітин як клінічний підхід до лікування гемоглобінопатії.

[0225] Всі патенти, патентні заявки і публікації, згадані в даному документі, включені до даного опису шляхом посилання у повному обсязі.

[0226] Хоча опис винаходу наданий більш детально шляхом ілюстрацій і прикладів для ясності розуміння, фахівцям в даній галузі техніки буде зрозуміло, що різні зміни і модифікації можуть бути здійснені без відступу від суті або обсягу розкриття. Відповідно, наведені вище

опис і приклади не повинні розглядатись як обмеження.

ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> SANGAMO BIOSCIENCES, INC.

<120> СПОСОБИ ТА КОМПОЗИЦІЇ ДЛЯ ЛІКУВАННЯ ГЕНЕТИЧНОГО ЗАХВОРЮВАННЯ

<130> 8325-0099.40

<140> РСТ/US2013/057214

<141> 2013-08-29

<150> 61/694,693

<151> 2012-08-29

<160> 258

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 102

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<400> 1

cagacaccat ggtgcacctg actcctgtgg agaagtctgc cgttactgcc ctgtggggca 60

aggatgaacgt ggatgaagtt ggtggtgagg ccctgggcag gt 102

<210> 2

<211> 102

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<400> 2

cagacaccat ggtgcacctg actcctgagg agaagtctgc cgttactgcc ctgtggggca 60

aggatgaacgt ggatgaagtt ggtggtgagg ccctgggcag gt 102

<210> 3

<211> 102

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<400> 3

cagacacat ggtgcatctg actcctgagg agaagactgc tgtcaatgcc ctgtggggca 60
aagtgaacgt ggatgcagtt ggtggtgagg ccctgggcag gt 102

<210> 4

<211> 101

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<400> 4

ctgacactgt agtgcatttc actgctgaca agaaggctgc tgccaccagc ctgtgaagca 60
aggttaaggt gagaaggctg gaggtgagat tctgggcagg t 101

<210> 5

<211> 102

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<400> 5

ctggcatcat ggtgcatttt actgctgagg agaaggctgc cgtcactagc ctgtggagca 60
agatgaatgt ggaagaggct ggaggtaag ccttgggcag gt 102

<210> 6

<211> 102

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<400> 6

cagacgcat ggtgcatttc acagaggagg acaaggctac taccacaagc ctgtggggca 60
aggatgaatgt ggaagatgct ggaggagaaa ccctgggaag gt 102

<210> 7

<211> 102

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<400> 7

cagacgcat gggtcatttc acagaggagg acaaggctac tatcacaagc ctgtggggca 60

aggtgaatgt ggaagatgct ggaggagaaa ccctgggaag gt 102

<210> 8

<211> 28

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний

олігонуклеотид

<400> 8

gggcagtaac ggcagacttc tcctcagg 28

<210> 9

<211> 7

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний

пептид

<400> 9

Asp Arg Ser Asn Leu Ser Arg

1 5

<210> 10

<211> 7

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний

пептид

<400> 10

Gln Ser Ser Asp Leu Arg Arg

1 5

<210> 11

<211> 7

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний

пептид

<400> 11

Arg Ser Asp Thr Leu Ser Ala

1 5

<210> 12

<211> 7

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний

пептид

<400> 12

Gln Ser Gly Ala Leu Ala Arg

1 5

<210> 13

<211> 7

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний

пептид

<400> 13

Gln Ser Gly Asp Leu Thr Arg

1 5

<210> 14

<211> 28

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний

олігонуклеотид

<400> 14

tggggcaagg tgaacgtgga tgaagttg 28

<210> 15

<211> 7

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний

пептид

<400> 15

Gln Ser Ala His Arg Lys Asn

1 5

<210> 16

<211> 7

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний
пептид

<400> 16

Leu Lys His His Leu Thr Asp

1 5

<210> 17

<211> 7

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний
пептид

<400> 17

Gln Arg Ser Asn Leu Val Arg

1 5

<210> 18

<211> 7

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний
пептид

<400> 18

Thr Ser Gly His Leu Ser Arg

1 5

<210> 19

<211> 7

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний

пептид

<400> 19

Gln Ser Asn His Leu Thr Glu

1 5

<210> 20

<211> 7

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний

пептид

<400> 20

Arg Ser His His Leu Lys Ala

1 5

<210> 21

<211> 28

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний

олігонуклеотид

<400> 21

agagtcaggt gcaccatggt gtctgttt 28

<210> 22

<211> 7

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний

пептид

<400> 22

Thr Asn Gln Asn Arg Ile Thr

1 5

<210> 23

<211> 7

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний

пептид

<400> 23

Asp Arg Ser Asn Arg Thr Thr

1 5

<210> 24

<211> 7

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний

пептид

<400> 24

Arg Asn Ala Ser Arg Thr Arg

1 5

<210> 25

<211> 7

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний

пептид

<400> 25

Arg Ser Asp Asn Leu Ser Glu

1 5

<210> 26

<211> 7

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний

пептид

<400> 26

Arg Ser Gln His Arg Lys Thr

1 5

<210> 27

<211> 28

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний

олігонуклеотид

<400> 27

gtggagaagt ctgccgttac tgcctgt 28

<210> 28

<211> 7

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний

пептид

<400> 28

Thr Ser Gly Ser Leu Ser Arg

1 5

<210> 29

<211> 7

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний

пептид

<400> 29

Asp Arg Ser Asp Leu Ser Arg

1 5

<210> 30

<211> 7

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний
пептид

<400> 30

Asp Arg Ser Ala Leu Ala Arg

1 5

<210> 31

<211> 7

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний
пептид

<400> 31

Gln Ser Ser Asn Leu Ala Arg

1 5

<210> 32

<211> 7

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний
пептид

<400> 32

Gln Ser Gly His Leu Ser Arg

1 5

<210> 33

<211> 28

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний

олігонуклеотид

<400> 33

acaggagtca ggtgcaccat ggtgtctg 28

<210> 34

<211> 7

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний

пептид

<400> 34

Asp Gln Ser Asn Leu Arg Ala

1 5

<210> 35

<211> 7

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний

пептид

<400> 35

Arg Ser Asp His Leu Thr Gln

1 5

<210> 36

<211> 28

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний

олігонуклеотид

<400> 36

gagaagtctg ccgttactgc cctgtggg 28

<210> 37

<211> 7

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний

пептид

<400> 37

Ala Arg Ser Thr Arg Thr Asn

1 5

<210> 38

<211> 7

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний

пептид

<400> 38

Asp Arg Ser Ala Arg Thr Arg

1 5

<210> 39

<211> 7

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний

пептид

<400> 39

Gln Ser Gly Asn Leu Ala Arg

1 5

<210> 40

<211> 28

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний

олігонуклеотид

<400> 40

taacggcaga ctctccaca ggagtcag 28

<210> 41

<211> 7

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний

пептид

<400> 41

Ser Ser Ser Asp Arg Lys Lys

1 5

<210> 42

<211> 7

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний

пептид

<400> 42

Gln Ser Ala Asp Arg Thr Lys

1 5

<210> 43

<211> 28

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний

олігонуклеотид

<400> 43

gccctgtggg gcaaggtgaa cgtggatg 28

<210> 44

<211> 7

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний

пептид

<400> 44

Leu Arg His His Leu Thr Arg

1 5

<210> 45

<211> 7

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний

пептид

<400> 45

Gln Ser Gly Asn Leu His Val

1 5

<210> 46

<211> 7

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний

пептид

<400> 46

Arg Ser Ala His Leu Ser Arg

1 5

<210> 47

<211> 7

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний

пептид

<400> 47

Arg Ser Asp Val Leu Ser Thr

1 5

<210> 48

<211> 7

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний

пептид

<400> 48

Arg Lys Gln Asp Leu Arg Thr

1 5

<210> 49

<211> 7

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний

пептид

<400> 49

Met Ser His His Leu Arg Asp

1 5

<210> 50

<211> 28

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний

олігонуклеотид

<400> 50

cacagggcag taacggcaga cttctcct 28

<210> 51

<211> 7

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний

пептид

<400> 51

Asp Arg Ser His Leu Thr Arg

1 5

<210> 52

<211> 7

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний

пептид

<400> 52

Arg Ser Asp Asn Leu Arg Glu

1 5

<210> 53

<211> 28

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний

олігонуклеотид

<400> 53

ggcaaggatga acgtggatga agttggtg 28

<210> 54

<211> 7

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний

пептид

<400> 54

Gln Ser Gly His Leu Ala Arg

1 5

<210> 55

<211> 7

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний

пептид

<400> 55

Val Ser His His Leu Arg Asp

1 5

<210> 56

<211> 28

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний

олігонуклеотид

<400> 56

atcccatgga gaggtggctg ggaaggac 28

<210> 57

<211> 7

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний

пептид

<400> 57

Arg Ser Asp Val Leu Ser Glu

1 5

<210> 58

<211> 7

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний

пептид

<400> 58

Arg Asn Gln His Arg Lys Thr

1 5

<210> 59

<211> 7

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний

пептид

<400> 59

Arg Ser Asp His Leu Ser Ala

1 5

<210> 60

<211> 7

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний

пептид

<400> 60

Arg Ser Ala Asn Leu Thr Arg

1 5

<210> 61

<211> 7

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний

пептид

<400> 61

Arg Ser Asp Val Leu Ser Asn

1 5

<210> 62

<211> 7

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний

пептид

<400> 62

Asp Arg Ser Thr Arg Ile Thr

1 5

<210> 63

<211> 28

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний

олігонуклеотид

<400> 63

atattgcaga caataacccc tttaacct

28

<210> 64

<211> 7

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний
пептид

<400> 64

His Arg Gln His Leu Val Thr

1 5

<210> 65

<211> 7

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний
пептид

<400> 65

Asp Arg Ser Asn Leu Thr Arg

1 5

<210> 66

<211> 7

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний
пептид

<400> 66

His Arg Ser Ser Leu Leu Asn

1 5

<210> 67

<211> 7

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний

пептид

<400> 67

Arg Ser Asp His Leu Ser Thr

1 5

<210> 68

<211> 7

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний

пептид

<400> 68

Arg Ser Ala Asp Leu Ser Arg

1 5

<210> 69

<211> 7

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний

пептид

<400> 69

Arg Ser Asp Asn Leu Ser Gln

1 5

<210> 70

<211> 7

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний

пептид

<400> 70

Ala Ser Asn Asp Arg Lys Lys

1 5

<210> 71

<211> 28

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний

олігонуклеотид

<400> 71

gtgcagaata tgccccgcag ggtatttg 28

<210> 72

<211> 7

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний

пептид

<400> 72

Arg Ser Asp Asn Leu Ser Ala

1 5

<210> 73

<211> 7

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний

пептид

<400> 73

Arg Asn Asn Asp Arg Lys Thr

1 5

<210> 74

<211> 7

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний

пептид

<400> 74

Thr Ser Ser Asn Arg Thr Lys

1 5

<210> 75

<211> 28

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний

олігонуклеотид

<400> 75

gggaaggggc ccagggcggt cagtgtgc

28

<210> 76

<211> 7

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний

пептид

<400> 76

Asp Arg Ser His Leu Ala Arg

1 5

<210> 77

<211> 7

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний

пептид

<400> 77

Ala Ser Lys Thr Arg Lys Asn

1 5

<210> 78

<211> 7

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний

пептид

<400> 78

Arg Ser Asp His Leu Ser Glu

1 5

<210> 79

<211> 28

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний

олігонуклеотид

<400> 79

асасасаgga tgacttcctc aaggtggg 28

<210> 80

<211> 7

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний

пептид

<400> 80

Thr Ser Gly Asn Leu Thr Arg

1 5

<210> 81

<211> 7

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний

пептид

<400> 81

Gln Ser Ala Ser Arg Lys Asn

1 5

<210> 82

<211> 28

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний

олігонуклеотид

<400> 82

cgccaccggg ctccgggccc gagaagtt 28

<210> 83

<211> 7

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний

пептид

<400> 83

Asp Ser Ser Asp Arg Lys Lys

1 5

<210> 84

<211> 7

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний

пептид

<400> 84

Arg Ser Asp Thr Leu Ser Glu

1 5

<210> 85

<211> 28

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний

олігонуклеотид

<400> 85

ccccagacct gcgctctggc gcccgagcg 28

<210> 86

<211> 7

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний

пептид

<400> 86

Arg Ser Asp Ser Leu Leu Arg

1 5

<210> 87

<211> 7

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний

пептид

<400> 87

Arg Leu Asp Trp Leu Pro Val

1 5

<210> 88

<211> 7

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний

пептид

<400> 88

Gln Ser Ser Asp Leu Ser Arg

1 5

<210> 89

<211> 7

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний

пептид

<400> 89

Ala Ala Ser Asn Arg Ser Lys

1 5

<210> 90

<211> 28

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний

олігонуклеотид

<400> 90

ggctcggggg ccggggctgg agccaggg 28

<210> 91

<211> 7

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний

пептид

<400> 91

Gln Ser Ser His Leu Thr Arg

1 5

<210> 92

<211> 7

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний

пептид

<400> 92

Gln Ser Ser Asp Leu Thr Arg

1 5

<210> 93

<211> 7

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний

пептид

<400> 93

His Ser Arg Thr Arg Thr Lys

1 5

<210> 94

<211> 7

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний

пептид

<400> 94

Arg Ser Asp His Leu Ser Arg

1 5

<210> 95

<211> 7

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний

пептид

<400> 95

Asp Arg Ser Ala Arg Asn Ser

1 5

<210> 96

<211> 28

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний

олігонуклеотид

<400> 96

aaggcgctgg cgctgcaacc ggtgtacc 28

<210> 97

<211> 7

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний

пептид

<400> 97

Gln Ser His Asn Arg Thr Lys

1 5

<210> 98

<211> 28

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний

олігонуклеотид

<400> 98

ttgcagcgcc agcgcttgg gctcgggg

28

<210> 99

<211> 7

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний

пептид

<400> 99

Arg Ser Asp His Leu Ser Gln

1 5

<210> 100

<211> 7

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний

пептид

<400> 100

His Arg Ser Ser Leu Gly Asp

1 5

<210> 101

<211> 7

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний

пептид

<400> 101

Arg Ser Asp Asp Leu Thr Arg

1 5

<210> 102

<211> 7

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний

пептид

<400> 102

Gln Arg Ser Thr Leu Ser Ser

1 5

<210> 103

<211> 7

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний

пептид

<400> 103

Arg Ser Ala Asp Leu Thr Arg

1 5

<210> 104

<211> 28

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний

олігонуклеотид

<400> 104

cggtgtaccc ggggcccggc gccggctc 28

<210> 105

<211> 7

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний

пептид

<400> 105

Arg Ser Thr His Leu Val Arg

1 5

<210> 106

<211> 7

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний

пептид

<400> 106

Arg Ser Asp Ser Leu Ser Thr

1 5

<210> 107

<211> 7

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний

пептид

<400> 107

Asp Ser Ser Asp Arg Thr Lys

1 5

<210> 108

<211> 7

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний

пептид

<400> 108

Arg Ser Ala Ala Leu Ala Arg

1 5

<210> 109

<211> 28

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний

олігонуклеотид

<400> 109

ttgcattgag atagtgtggg gaaggggc 28

<210> 110

<211> 7

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний

пептид

<400> 110

Arg Ser Asp His Leu Ser Val

1 5

<210> 111

<211> 7

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний

пептид

<400> 111

Arg Ser Asp Val Arg Lys Thr

1 5

<210> 112

<211> 7

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний

пептид

<400> 112

Arg Ser Asp Tyr Leu Ser Lys

1 5

<210> 113

<211> 7

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний

пептид

<400> 113

Thr Ser Ser Val Arg Thr Thr

1 5

<210> 114

<211> 7

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний

пептид

<400> 114

Arg Pro Tyr Thr Leu Arg Leu

1 5

<210> 115

<211> 7

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний

пептид

<400> 115

Gln Asn Ala Thr Arg Thr Lys

1 5

<210> 116

<211> 28

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний

олігонуклеотид

<400> 116

atctgtctga aacggtcctt ggctaaac 28

<210> 117

<211> 7

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний

пептид

<400> 117

Arg Arg Asp Ile Leu His Gln

1 5

<210> 118

<211> 7

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний

пептид

<400> 118

Leu Ala Tyr Asp Arg Arg Lys

1 5

<210> 119

<211> 28

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний

олігонуклеотид

<400> 119

tttgattga gatagtgtgg ggaagggg 28

<210> 120

<211> 7

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний

пептид

<400> 120

Gln Ser Cys Ala Arg Asn Val

1 5

<210> 121

<211> 7

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний

пептид

<400> 121

Arg Ser Asp Asn Leu Ala Arg

1 5

<210> 122

<211> 7

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний

пептид

<400> 122

His Arg Asn Thr Leu Leu Gly

1 5

<210> 123

<211> 7

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний

пептид

<400> 123

Met Arg Asn Arg Leu Asn Arg

1 5

<210> 124

<211> 28

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний

олігонуклеотид

<400> 124

ctgtctgaaa cggccctgg ctaaactc 28

<210> 125

<211> 7

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний

пептид

<400> 125

Arg Arg Asp Ala Leu Leu Met

1 5

<210> 126

<211> 7

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний

пептид

<400> 126

Gln Asn Ala His Arg Lys Thr

1 5

<210> 127

<211> 28

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний

олігонуклеотид

<400> 127

tatttgcatt gagatagtgt gggaagg 28

<210> 128

<211> 7

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний

пептид

<400> 128

Leu Gln His His Leu Thr Asp

1 5

<210> 129

<211> 7

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний

пептид

<400> 129

Thr Ser Thr His Leu His Ile

1 5

<210> 130

<211> 7

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний

пептид

<400> 130

His Lys Trp Val Leu Arg Gln

1 5

<210> 131

<211> 7

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний

пептид

<400> 131

Arg Arg Asp Ala Leu Leu Met

1 5

<210> 132

<211> 97

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<400> 132

cccttcccca cactatctca atgcaaatat gtctctgaaa cggtccctgg ctaaactcca 60

cccatggggtt ggccttgcct tgaccaatag ccttgac 97

<210> 133

<211> 17

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний

олігонуклеотид

<400> 133

gtatcctctt gggggcc 17

<210> 134

<211> 13

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний

олігонуклеотид

<400> 134

atcctcttrr rrg 13

<210> 135

<211> 21

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний

олігонуклеотид

<400> 135

atatttgcac tgagatagtg t 21

<210> 136

<211> 17

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний

олігонуклеотид

<400> 136

atttrcattr arataat 17

<210> 137

<211> 14

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний

олігонуклеотид

<400> 137

atcctcttrr rrrc 14

<210> 138

<211> 15

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний

олігонуклеотид

<400> 138

atcctcttrr rrrcc 15

<210> 139

<211> 14

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний

олігонуклеотид

<400> 139

atttrcatrr arat 14

<210> 140

<211> 51

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<400> 140

ggccagcctt gccttgacca atagccttga caaggcaaac ttgaccaata g 51

<210> 141

<211> 50

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<400> 141

ggccagcctt gccttgacca tagccttgac aaggcaaact tgaccaatag 50

<210> 142

<211> 47

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<400> 142

ggccagcctt gccttaatag ccttgacaag gcaaactga ccaatag	47
<210> 143	
<211> 45	
<212> ДНК	
<213> Homo sapiens	
<400> 143	
ggccagcctt gccttgaccc ttgacaaggc aaacttgacc aatag	45
<210> 144	
<211> 45	
<212> ДНК	
<213> Homo sapiens	
<400> 144	
ggccagcctt gccttgacca atagcaaggc aaacttgacc aatag	45
<210> 145	
<211> 38	
<212> ДНК	
<213> Homo sapiens	
<400> 145	
ggccagcctt gccttgacaa ggcaaacttg accaatag	38
<210> 146	
<211> 51	
<212> ДНК	
<213> Homo sapiens	
<400> 146	
ggccagcctt gccttgacca aatagccttg acaaggcaaa cttgaccaat a	51
<210> 147	
<211> 51	
<212> ДНК	

<213> Homo sapiens

<400> 147

ggccagcctt gccttgacca atagcagcct tgacaaggca aacttgacca a 51

<210> 148

<211> 51

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<400> 148

ggccagcctt gccttgacca atagaatagc cttgacaagg caaacttgac c 51

<210> 149

<211> 196

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<400> 149

tagctaaagg gaagaataaa ttagagaaaa actggaatga ctgaatcgga acaaggcaaa 60

ggctataaaa aaaattagca gtatcctctt gggggcccct tccccacact atctcaatgc 120

aaatatctgt ctgaaacggt ccctggctaa actccaccca tgggttgcc agccttgctt 180

tgaccaatag ccttga 196

<210> 150

<211> 200

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<400> 150

tagctaaagg gaagaataaa ttagagaaaa attggaatga ctgaatcgga acaaggcaaa 60

ggctataaaa aaaattaagc agcagtatcc tcttgggggc cccttcccca cactatctca 120

atgcaaatat ctgtctgaaa cggtcctgg ctaaactcca cccatgggtt ggccagcctt 180

gccttgacca atagccttga 200

<210> 151

<211> 300

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<400> 151

```
caaggcaaac ttgaccaata gtcttagagt atccagtgag gccaggggcc ggcggctggc   60
tagggatgaa gaataaaagg aagcacctt cagcagttcc acacactcgc ttctggaacg   120
tctgaggtta tcaataagct cctagtccag acgcatggg tcatttcaca gaggaggaca   180
aggctactat cacaagcctg tggggcaagg tgaatgtgga agatgctgga ggagaaaccc   240
tgggaaggta ggctctggtg accaggacaa gggagggaag gaaggaccct gtgcctggca   300
```

<210> 152

<211> 300

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<400> 152

```
caaggcaaac ttgaccaata gtcttagagt atccagtgag gccaggggcc ggcggctggc   60
tagggatgaa gaataaaagg aagcacctt cagcagttcc acacactcgc ttctggaacg   120
tctgaggtta tcaataagct cctagtccag acgcatggg tcatttcaca gaggaggaca   180
aggctactat cacaagcctg tggggcaagg tgaatgtgga agatgctgga ggagaaaccc   240
tgggaaggta ggctctggtg accaggacaa gggagggaag gaaggaccct gtgcctggca   300
```

<210> 153

<211> 7

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний

пептид

<400> 153

Gln Ser Gly Thr Arg Lys Thr

1 5

<210> 154

<211> 7

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний

пептид

<400> 154

Arg Ser Asp Asn Leu Ser Thr

1 5

<210> 155

<211> 7

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний

пептид

<400> 155

Asp Ser Ala Asn Arg Ile Lys

1 5

<210> 156

<211> 7

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний

пептид

<400> 156

Ala Met Gln Thr Leu Arg Val

1 5

<210> 157

<211> 7

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний

пептид

<400> 157

Arg Asn Ser Asp Arg Thr Lys

1 5

<210> 158

<211> 28

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний

олігонуклеотид

<400> 158

atcaagggtta caagacaggt ttaaggag 28

<210> 159

<211> 28

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний

олігонуклеотид

<400> 159

aatctgcccc ggcctcacc accaactt 28

<210> 160

<211> 28

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний

олігонуклеотид

<400> 160

ctccagaagg ggatcatgac ctctctac 28

<210> 161

<211> 7

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний

пептид

<400> 161

Leu Arg Gln Asn Leu Ile Met

1 5

<210> 162

<211> 7

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний

пептид

<400> 162

Thr Ser Ala Asn Leu Thr Val

1 5

<210> 163

<211> 7

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний

пептид

<400> 163

Gln Arg Asn Asp Arg Lys Ser

1 5

<210> 164

<211> 7

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний

пептид

<400> 164

Leu Gln Ser Gln Leu Asn Arg

1 5

<210> 165

<211> 7

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний

пептид

<400> 165

Asp Arg Ala Asn Leu Ser Arg

1 5

<210> 166

<211> 7

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний

пептид

<400> 166

Thr Ser Ser Asn Arg Asn His

1 5

<210> 167

<211> 7

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний

пептид

<400> 167

His Ser Gly Asn Leu Thr Lys

1 5

<210> 168

<211> 7

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний
пептид

<400> 168

Gln Lys Val Asp Leu Ser Arg

1 5

<210> 169

<211> 7

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний
пептид

<400> 169

Gln Ala Asn Asn Leu Lys Val

1 5

<210> 170

<211> 28

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний
олігонуклеотид

<400> 170

cccaacgggc cgtggtctgg ttcacat

28

<210> 171

<211> 7

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний

пептид

<400> 171

Arg Ser Asp Ser Leu Ser Arg

1 5

<210> 172

<211> 7

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний

пептид

<400> 172

Asp Arg Ser Val Arg Thr Lys

1 5

<210> 173

<211> 7

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний

пептид

<400> 173

Gln Arg Ser Asn Leu Lys Val

1 5

<210> 174

<211> 7

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний

пептид

<400> 174

Arg Ser Asp His Leu Thr Thr

1 5

<210> 175

<211> 7

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний

пептид

<400> 175

Trp Ala Thr Ala Arg Asp Arg

1 5

<210> 176

<211> 7

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний

пептид

<400> 176

His Thr Lys Ser Leu Ser Arg

1 5

<210> 177

<211> 7

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний

пептид

<400> 177

Arg Ser Ala His Leu Thr Gln

1 5

<210> 178

<211> 7

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний

пептид

<400> 178

Asp Arg Ser Val Leu Arg Arg

1 5

<210> 179

<211> 28

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний

олігонуклеотид

<400> 179

atattgcaga caataacccc tttaacct 28

<210> 180

<211> 7

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний

пептид

<400> 180

His Arg Trp Leu Arg Ser Asn

1 5

<210> 181

<211> 7

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний

пептид

<400> 181

Asp Ser Ser His Arg Thr Arg

1 5

<210> 182

<211> 7

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний

пептид

<400> 182

Gln Ser Ala His Leu Lys Ala

1 5

<210> 183

<211> 28

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний

олігонуклеотид

<400> 183

ctcactgtcc acaggagaag ccacacgg 28

<210> 184

<211> 7

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний

пептид

<400> 184

Arg Ser Ala Asn Leu Ala Arg

1 5

<210> 185

<211> 7

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний

пептид

<400> 185

Arg Leu Asp Asn Arg Thr Ala

1 5

<210> 186

<211> 7

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний

пептид

<400> 186

Gln Ser Asn Asp Leu Asn Ser

1 5

<210> 187

<211> 7

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний

пептид

<400> 187

Trp Arg Ser Ser Leu Lys Thr

1 5

<210> 188

<211> 7

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний

пептид

<400> 188

Asp Arg Ser Asn Arg Lys Thr

1 5

<210> 189

<211> 28

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний

олігонуклеотид

<400> 189

ttgctacagt tcttgaagac ttccac 28

<210> 190

<211> 7

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний

пептид

<400> 190

Tyr Lys His Val Leu Ser Asp

1 5

<210> 191

<211> 7

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний

пептид

<400> 191

Thr Ser Gly Ser Leu Thr Arg

1 5

<210> 192

<211> 7

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний

пептид

<400> 192

Leu Lys Asp Thr Leu Arg Arg

1 5

<210> 193

<211> 28

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний

олігонуклеотид

<400> 193

gagaagccac acgggcgaaa ggccttat 28

<210> 194

<211> 7

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний

пептид

<400> 194

Gln Ser Gly Asn Leu Asp Ser

1 5

<210> 195

<211> 7

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний

пептид

<400> 195

Gln Asn Ala Thr Arg Ile Asn

1 5

<210> 196

<211> 7

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний

пептид

<400> 196

Trp Asn Ser Asp Leu Arg Lys

1 5

<210> 197

<211> 28

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний

олігонуклеотид

<400> 197

tggacagtga gattgctaca gttcttga 28

<210> 198

<211> 7

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний

пептид

<400> 198

Tyr Lys Trp Thr Leu Arg Asn

1 5

<210> 199

<211> 7

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний

пептид

<400> 199

Thr Ser Thr Lys Leu Arg Thr

1 5

<210> 200

<211> 28

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний

олігонуклеотид

<400> 200

gccacacggg cgaaggcct tataaatg 28

<210> 201

<211> 7

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний

пептид

<400> 201

Arg Ser Asp Thr Leu Ser Thr

1 5

<210> 202

<211> 7

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний
пептид

<400> 202

Asp Ser Ser Asn Arg Ile Asn

1 5

<210> 203

<211> 28

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний
олігонуклеотид

<400> 203

ctcctgtgga cagtgagatt gctacagt 28

<210> 204

<211> 7

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний
пептид

<400> 204

Asn Asp Leu Phe Leu Tyr Leu

1 5

<210> 205

<211> 7

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний

пептид

<400> 205

Arg Ser Asp Ser Leu Ser Val

1 5

<210> 206

<211> 7

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний

пептид

<400> 206

His Asn Asp Ser Arg Lys Asn

1 5

<210> 207

<211> 28

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний

олігонуклеотид

<400> 207

aagctcaccа ggcacatgaa aacgcatg

28

<210> 208

<211> 7

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний

пептид

<400> 208

Cys Arg Gln Asn Leu Ala Asn

1 5

<210> 209

<211> 7

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний

пептид

<400> 209

Tyr Gln Gly Val Leu Thr Arg

1 5

<210> 210

<211> 7

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний

пептид

<400> 210

His Arg Ser Ser Leu Arg Arg

1 5

<210> 211

<211> 28

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний

олігонуклеотид

<400> 211

ctactctggg cacaggcata gttgcaca 28

<210> 212

<211> 7

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний

пептид

<400> 212

Arg Ser Asp Ala Leu Ser Glu

1 5

<210> 213

<211> 28

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний

олігонуклеотид

<400> 213

ctcaccaggc acatgaaaac gcatggcc 28

<210> 214

<211> 7

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний

пептид

<400> 214

Gly Ser Ser Ala Leu Thr Gln

1 5

<210> 215

<211> 7

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний

пептид

<400> 215

Thr Ala Ser His Leu Lys Glu

1 5

<210> 216

<211> 7

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний

пептид

<400> 216

Ser Ser Arg Asn Leu Ala Ser

1 5

<210> 217

<211> 7

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний

пептид

<400> 217

Thr Ser Ala Asn Leu Ser Arg

1 5

<210> 218

<211> 28

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний

олігонуклеотид

<400> 218

ggtgaggagg agatccaggt cccaggtg 28

<210> 219

<211> 7

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний

пептид

<400> 219

Asn Asn Arg Asp Leu Ile Asn

1 5

<210> 220

<211> 7

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний

пептид

<400> 220

Thr Ser Ser Asn Leu Ser Arg

1 5

<210> 221

<211> 7

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний

пептид

<400> 221

Gln Arg Thr His Leu Asn Ser

1 5

<210> 222

<211> 28

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний

олігонуклеотид

<400> 222

cttctcgggc ccggagcccg gtggcgcg 28

<210> 223

<211> 7

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний

пептид

<400> 223

Arg Lys Ser Asp Arg Ile Lys

1 5

<210> 224

<211> 28

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний

олігонуклеотид

<400> 224

tggtaaggc aaggctggcc aaccatg 28

<210> 225

<211> 28

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний

олігонуклеотид

<400> 225

gccttgacaa ggcaaaacttg accaatag 28

<210> 226

<211> 7

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний

пептид

<400> 226

Gln Ser Gly Ser Leu Thr Arg

1 5

<210> 227

<211> 7

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний

пептид

<400> 227

Arg Ser Asp Asn Leu Ser Val

1 5

<210> 228

<211> 7

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний

пептид

<400> 228

Leu Lys Phe Ala Leu Ala Asn

1 5

<210> 229

<211> 7

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний

пептид

<400> 229

Asn Pro Ala Asn Leu Thr Arg

1 5

<210> 230

<211> 7

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний

пептид

<400> 230

Asp Ser Ser Ala Arg Lys Lys

1 5

<210> 231

<211> 39

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<400> 231

accatggtgc acctgactcc tgaggagaag tctgccgtt 39

<210> 232

<211> 39

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний

олігонуклеотид

<400> 232

accatggtgc atctgactcc tgaggaaaaa agcgctgtg 39

<210> 233

<211> 88

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний

олігонуклеотид

<400> 233

cggtcacctt gccccacagg gcagtaacag cagatttttc ctcaggagtc aggtgcacca 60

tggtgtctgt ttgaggtgc tagtgaac 88

<210> 234

<211> 88

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний

олігонуклеотид

<400> 234

cgttcacctt gccccacagg gcagtaacgg cagatttttc ctcaggagtc aggtgcacca 60

tggtgtctgt ttgaggttgc tagtgaac 88

<210> 235

<211> 101

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний

полінуклеотид

<400> 235

cttcacccac gttcaccttg cccccacagg cagtaacagc agatttttcc tcaggagtca 60

gggtgcaccat ggtgtctgtt tgaggttgc agtgaacaca g 101

<210> 236

<211> 20

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний

олігонуклеотид

<400> 236

ctgtgggcag tgccagatga 20

<210> 237

<211> 16

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний

олігонуклеотид

<400> 237

rtrrrcartr cscarat

16

<210> 238

<211> 20

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний

олігонуклеотид

<400> 238

ctcgataaaa ataagaatgt

20

<210> 239

<211> 17

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний

олігонуклеотид

<220>

<221> модифікована основа

<222> (16)..(16)

<223> a, c, t or g

<400> 239

crataaaaaat aaraang

17

<210> 240

<211> 21

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний

олігонуклеотид

<400> 240

atgtccttcc cagccacctc t 21

<210> 241

<211> 17

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний

олігонуклеотид

<400> 241

rtccttccca rccacct 17

<210> 242

<211> 19

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний

олігонуклеотид

<400> 242

gttaaagggg ttattgtct 19

<210> 243

<211> 15

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний

олігонуклеотид

<400> 243

taaarrrrtt attrt 15

<210> 244

<211> 21

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний

пептид

<400> 244

His Thr Lys Ile His Leu Arg Gly Ser Gln Leu Val Lys Ser Lys Ser

1 5 10 15

Glu Ala Ala Ala Arg

20

<210> 245

<211> 21

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний

пептид

<400> 245

His Thr Lys Ile His Leu Arg Gly Ser Tyr Ala Pro Met Pro Pro Leu

1 5 10 15

Ala Leu Ala Ser Pro

20

<210> 246

<211> 124

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний

полінуклеотид

<400> 246

acactatctc aatgcaaata tctgtctgaa acgggtccctg gctaaactcc acccatgggt 60

tggccagcct tgccttgaca aggcaaaactt gaccaatagt ctagagtat ccagtgaggc 120

cagg 124

<210> 247

<211> 124

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний

полінуклеотид

<400> 247

cctggcctca ctggatactc taagactatt ggtcaagttt gccttgtaa ggcaaggctg 60

gccaaaccat ggggtggagtt tagccaggga ccgtttcaga cagatatttg cattgagata 120

gtgt 124

<210> 248

<211> 21

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний

олігонуклеотид

<400> 248

gttgccagc ctgccttg a 21

<210> 249

<211> 17

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний

олігонуклеотид

<400> 249

trccarcct trccttg 17

<210> 250

<211> 21

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний

олігонуклеотид

<400> 250

ttgtcaagt ttgcctgtc a 21

<210> 251

<211> 17

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний

олігонуклеотид

<400> 251

rrtcaarttt rccttrt 17

<210> 252

<211> 9

<212> PRT

<213> Unknown

<220>

<223> Опис невідомого сімейного пептиду: 'LAGLIDADG'

<400> 252

Leu Ala Gly Leu Ile Asp Ala Asp Gly

1 5

<210> 253

<211> 28

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний

олігонуклеотид

<400> 253

catcccaggc gtggggatta gagctcca 28

<210> 254

<211> 18

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний

олігонуклеотид

<400> 254

gtatcctctt gggggccc 18

<210> 255

<211> 19

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний

олігонуклеотид

<400> 255

atatttgcac tgagatagt 19

<210> 256

<211> 19

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний

олігонуклеотид

<400> 256

gtatcctctt gggggcccc 19

<210> 257

<211> 18

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний

олігонуклеотид

<400> 257

atatttgcac tgagatag

18

<210> 258

<211> 15

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний

олігонуклеотид

<400> 258

atttccattr arata

15

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

1. Генетично модифікована клітина-попередник червоних клітин крові, яка характеризується геномною модифікацією у межах екзону 2 або екзону 4 BCL11A або у межах BCL11A-XL, виконаною після розщеплення у межах гена BCL11A нуклеазою "цинкові пальці" (ZFN), нуклеазою TALE (TALEN) або системою CRISPR/Cas, які зв'язуються із сайтом-мішенню, що містить нуклеотиди в межах будь-якої із SEQ ID NO: 56, 63, 66, 71, 160, 170, 179, 183, 189, 193, 197, 200, 203, 207, 211 і 213 таким чином, що ген BCL11A інактивується і підвищується експресія глобіну.

2. Генетично модифікована клітина-попередник червоних клітин крові за п. 1, яка **відрізняється** тим, що геномну модифікацію вибрано з групи, яка складається з інсерцій і/або делецій.

3. Генетично модифікована клітина-попередник червоних клітин крові за п. 1 або п. 2, яка **відрізняється** тим, що клітина є гемопоетичною стовбуровою клітиною або клітиною-попередником червоних клітин крові, диференційованою у червону клітину крові (ЧКК).

4. Генетично модифікована клітина-попередник червоних клітин крові за п. 1, яка **відрізняється** тим, що:

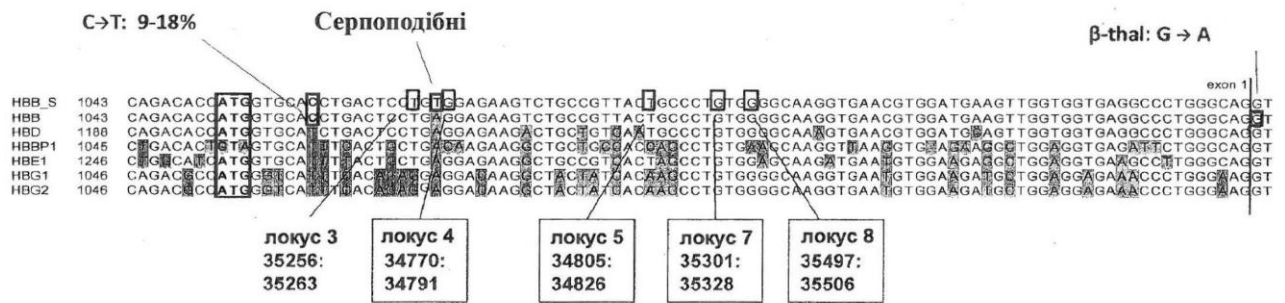
(а) ген BCL11A розщеплений нуклеазою "цинкові пальці";

(б) нуклеаза введена у клітину як полінуклеотид; або

(в) геномна модифікація включає вбудовування донорського полінуклеотиду, який кодує трансген.

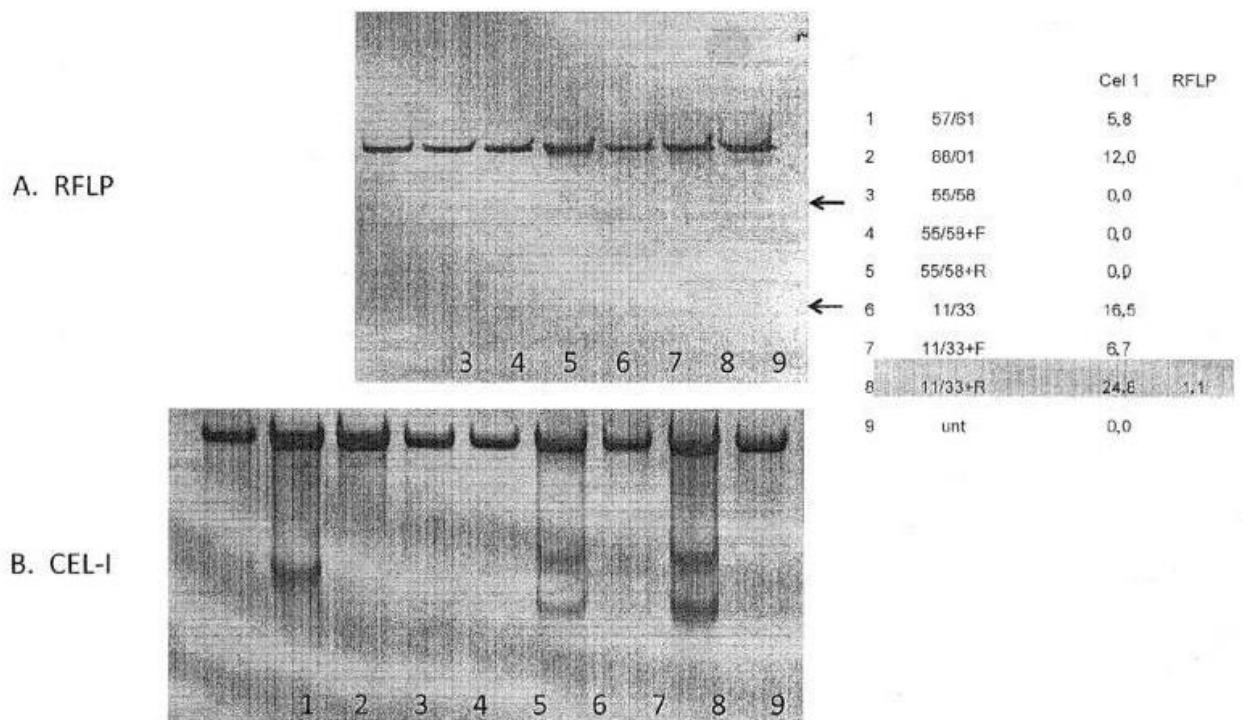
5. Генетично модифікована клітина-попередник червоних клітин крові за п. 1, яка **відрізняється** тим, що нуклеаза "цинкові пальці" включає білок "цинкові пальці", який містить 5 або 6 доменів "цинкових пальців", що містять спіральні ділянки розпізнавання, а також де зазначений білок "цинкові пальці" містить спіральні ділянки розпізнавання білків, у порядку, представленому у одному рядку Таблиці 1А, позначених як SBS#39172, SBS#43490, SBS#44642, SBS#45148, SBS#45147, SBS#39145, SBS#44490, SBS#44489, SBS#45081, SBS#44493, SBS#29527, SBS#29528, SBS#29525, SBS#29526, SBS#34678, SBS#34642, SBS#44889, SBS#44888, SBS#44905, SBS#44904, SBS#44911, SBS#44910, SBS#44945, SBS#44944, SBS#44947 або SBS#44946.

6. Білок "цинкові пальці", який містить 5 або 6 доменів "цинкових пальців", що містять спіральні ділянки розпізнавання, а також де зазначений білок "цинкові пальці" містить спіральні ділянки розпізнавання білків, у порядку, представленому у одному рядку Таблиці 1А, позначених як SBS#39172, SBS#43490, SBS#44642, SBS#45148, SBS#45147, SBS#39145, SBS#44490, SBS#44489, SBS#45081, SBS#44493, SBS#29527, SBS#29528, SBS#29525, SBS#29526, SBS#34678, SBS#34642, SBS#44889, SBS#44888, SBS#44905, SBS#44904, SBS#44911, SBS#44910, SBS#44945, SBS#44944, SBS#44947 або SBS#44946.
7. Злитий білок, що містить білок "цинкові пальці" за п. 6, а також дикотипний чи сконструйований домен розщеплення або дикотипний чи сконструйований напівдомен розщеплення.
8. Полінуклеотид, що кодує один або більше білків за п. 6 або п. 7.
9. Виділена клітина, що містить один або більше злитих білків за п. 7 або один або більше полінуклеотидів за п. 8.
10. Клітина за п. 9, яка **відрізняється** тим, що клітину вибрано з групи, яка складається з клітини-попередника червоних клітин крові (ЧКК), ЧКК, диференційованої з клітини-попередника ЧКК, або гемопоетичної стовбурової клітини CD34+.
11. Набір, що містить білок за п. 6, злитий білок за п. 7 або полінуклеотид за п. 8.
12. Спосіб зміни експресії глобінових генів у клітині *in vitro*, який включає: введення в клітину одного або більше білків за п. 6 або п. 7 чи одного або більше полінуклеотидів за п. 8 за таких умов, щоб один або більше білків експресувались і експресія глобінового гена змінювалась.
13. Спосіб за п. 12, у якому:
- (а) білки підвищують експресію глобінового гена, такого як ген гамма-глобіну або бета-глобіну;
 - (б) спосіб додатково включає вбудовування у геном клітини донорської послідовності, наприклад, шляхом введення донорської послідовності у клітину за допомогою вірусного вектора, олігонуклеотиду або плазмід;
 - (в) клітина являє собою клітину-попередника червоних клітин крові (ЧКК), таку як гемопоетична стовбурова клітина CD34+; і/або
 - (г) донорська послідовність включає трансген під контролем ендогенного або екзогенного промотора.
14. Один або більше білків за п. 6 або п. 7 чи один або більше полінуклеотидів за п. 8 для застосування у лікуванні гемоглобінопатії, де спосіб включає: введення в клітину одного або більше білків за п. 6 або п. 7 чи одного або більше полінуклеотидів за п. 8 за таких умов, щоб один або більше білків експресувались і експресія глобінового гена змінювалась так, щоб гемоглобінопатія піддавалась лікуванню.
15. Один або більше білків за п. 6 або п. 7 чи один або більше полінуклеотидів за п. 8 для застосування у лікуванні гемоглобінопатії за п. 14, де гемоглобінопатія являє собою таласемію.
16. Один або більше білків за п. 6 або п. 7 чи один або більше полінуклеотидів за п. 8 для застосування у лікуванні серпоподібно-клітинної хвороби, де спосіб включає: введення в клітину одного або більше білків за п. 6 або п. 7 чи одного або більше полінуклеотидів за п. 8 за таких умов, щоб один або більше білків експресувались і експресія глобінового гена змінювалась так, щоб серпоподібно-клітинна хвороба піддавалась лікуванню.

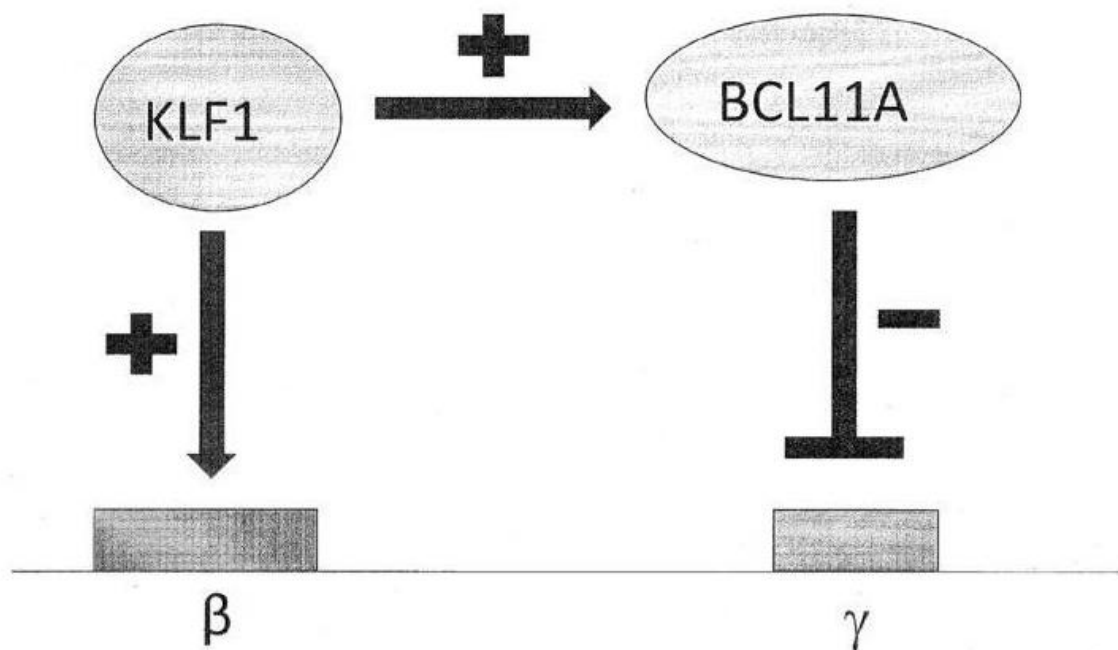


Локус	% інсерційно-делеційних мутацій, дослідження CD34	
	Експеримент 1	Експеримент 2
3	13.3	0.0
4	0.0	0.0
5	36.8	25.6
6	42.0	23.7
7	23.2	19.9

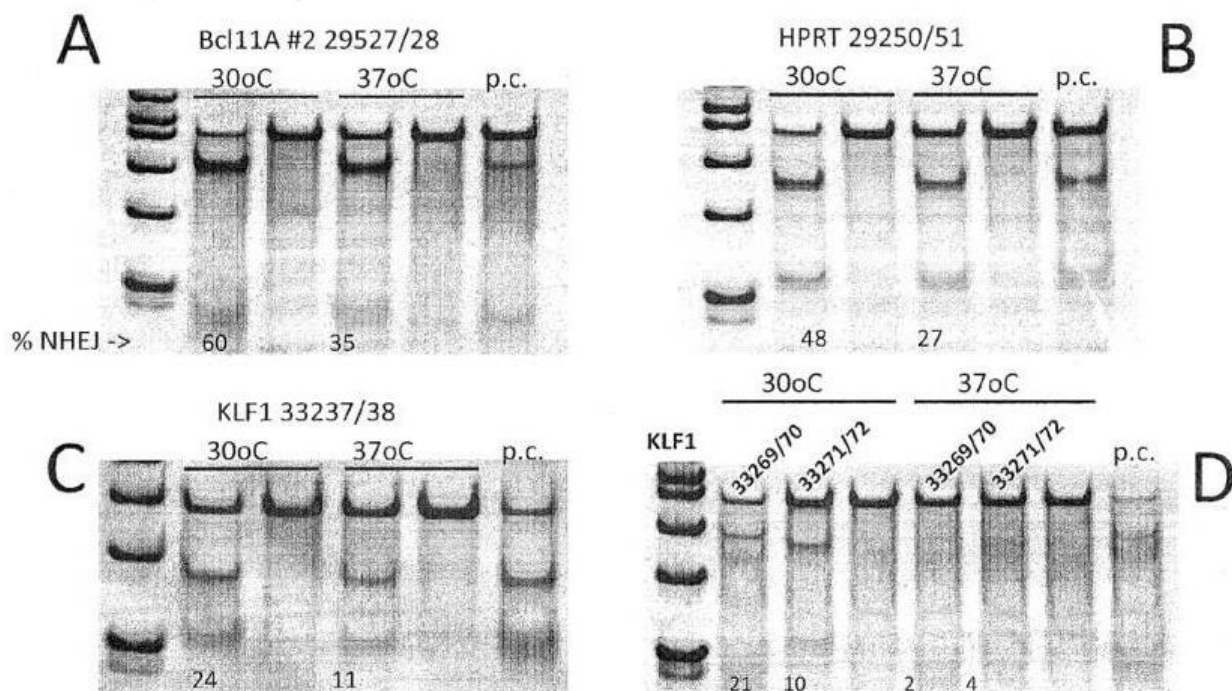
Фігура 1



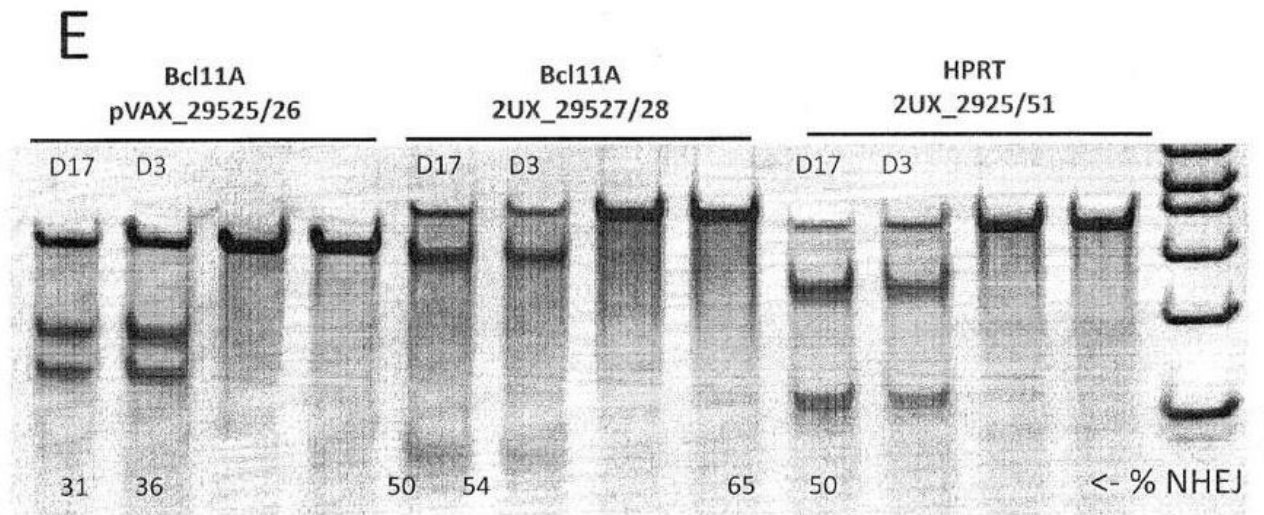
Фігура 2



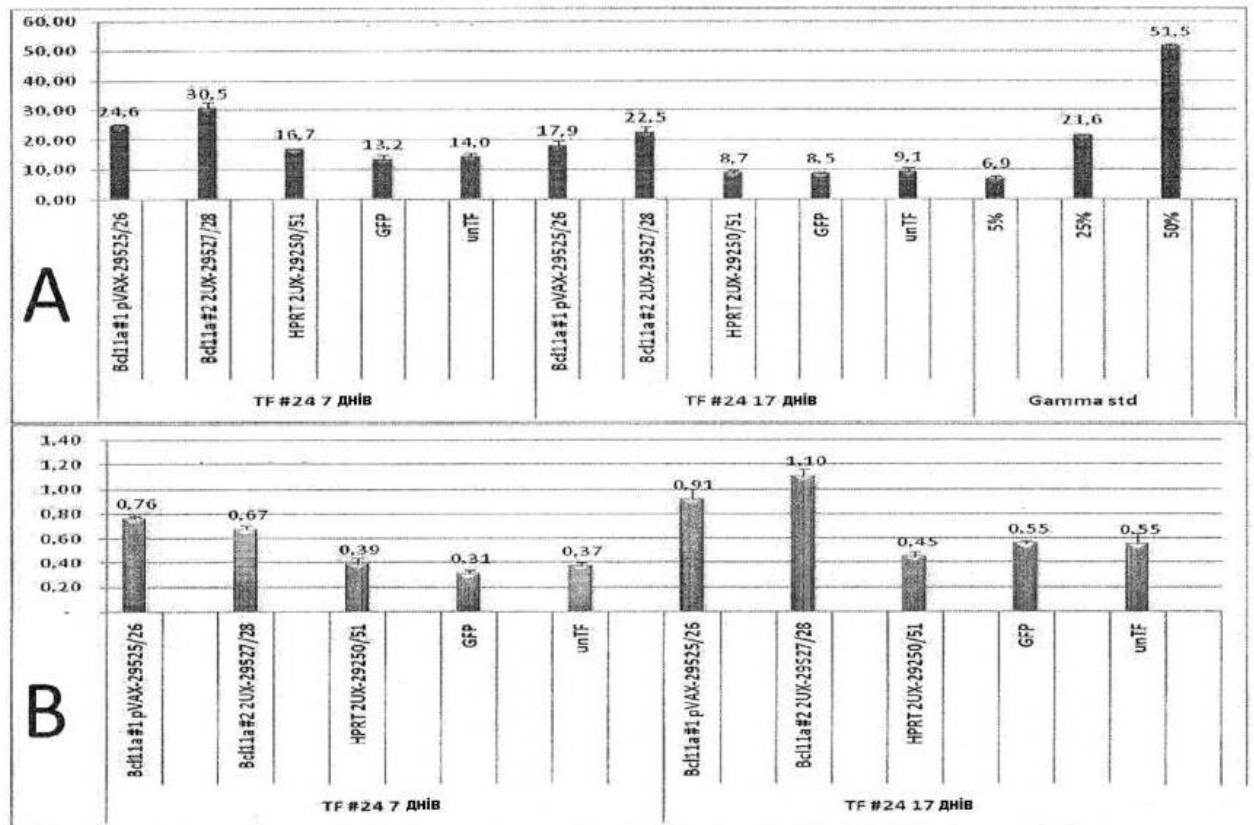
Φίγυρα 3



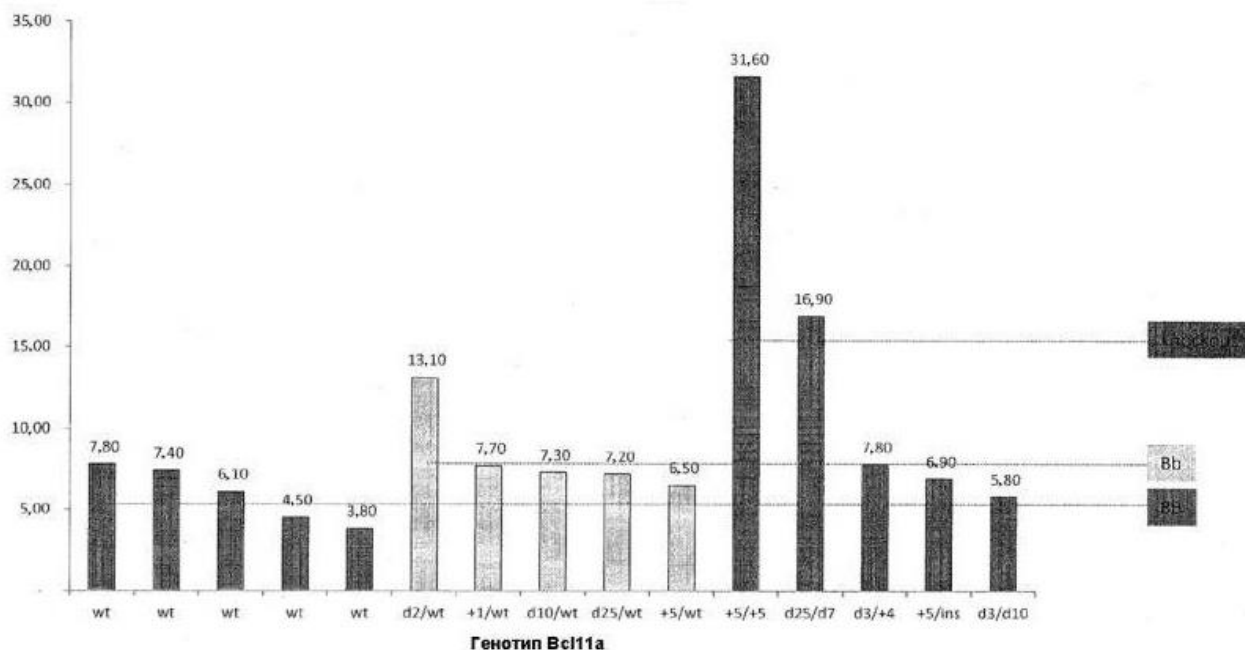
Φίγυρα 4



Фігура 4



Фігура 5



Фігура 6

Етапон

GGCCAGCCTTGCCTTGACCAATAGCCTTGACAAGGCAAACCTTGACCAATAG

wt (26)

GGCCAGCCTTGCCTTGACCAATAGCCTTGACAAGGCAAACCTTGACCAATAG

Δ1bp (1)

GGCCAGCCTTGCCTTGACC-ATAGCCTTGACAAGGCAAACCTTGACCAATAG

Δ4bp (1)

GGCCAGCCTTGCCTT----AATAGCCTTGACAAGGCAAACCTTGACCAATAG

Δ6bp (2)

GGCCAGCCTTGCCTTGAC-----CCTTGACAAGGCAAACCTTGACCAATAG

Δ6bp (1)

GGCCAGCCTTGCCTTGACCAATAGC-----AAGGCAAACCTTGACCAATAG

Δ13bp (9)

GGCCAGCCTTGCCTTGAC-----AAGGCAAACCTTGACCAATAG

+1bp (1)

GGCCAGCCTTGCCTTGACCAATAGCCTTGACAAGGCAAACCTTGACCAATA

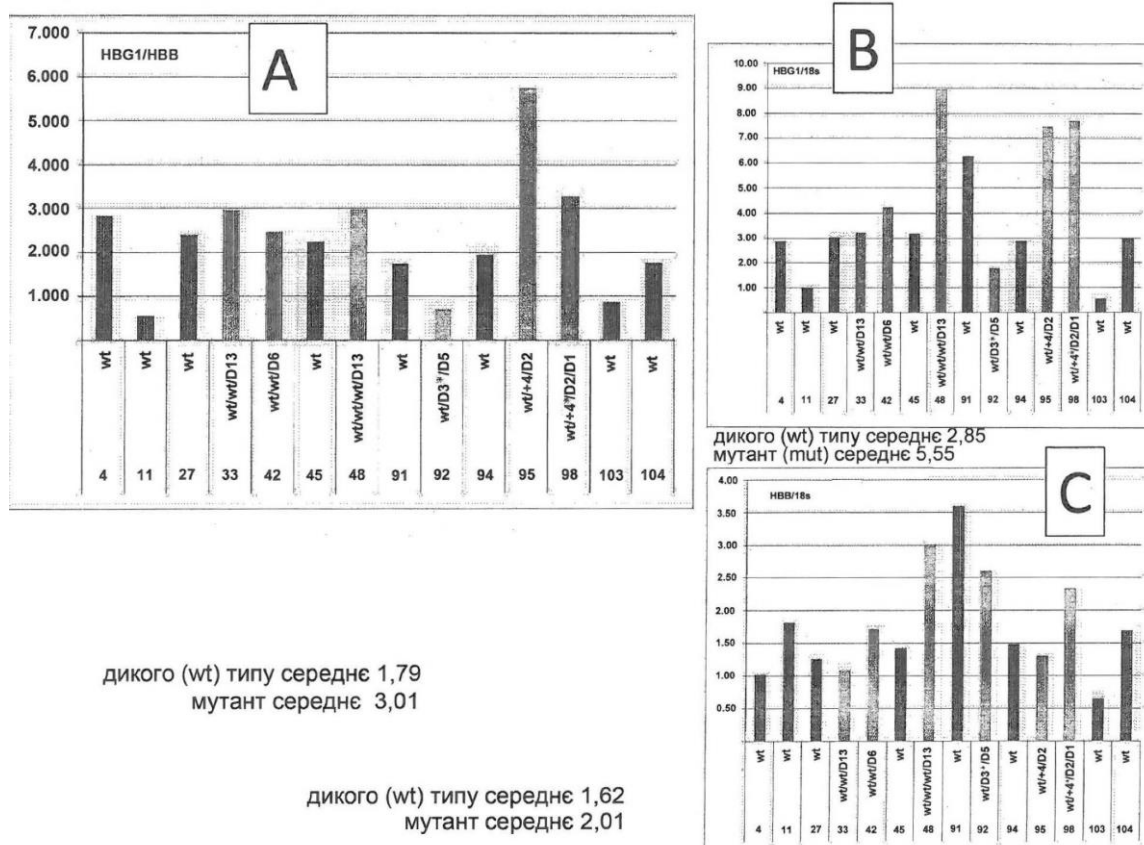
+3bp (1)

GGCCAGCCTTGCCTTGACCAATAGCAGCCTTGACAAGGCAAACCTTGACCAA

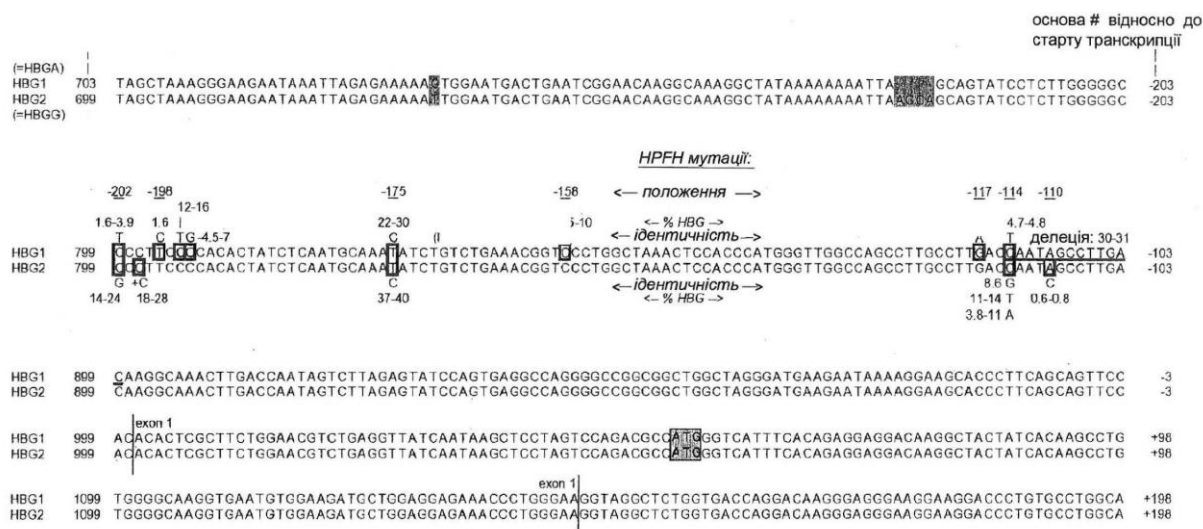
+5bp (3)

GGCCAGCCTTGCCTTGACCAATAGAATAGCCTTGACAAGGCAAACCTTGACC

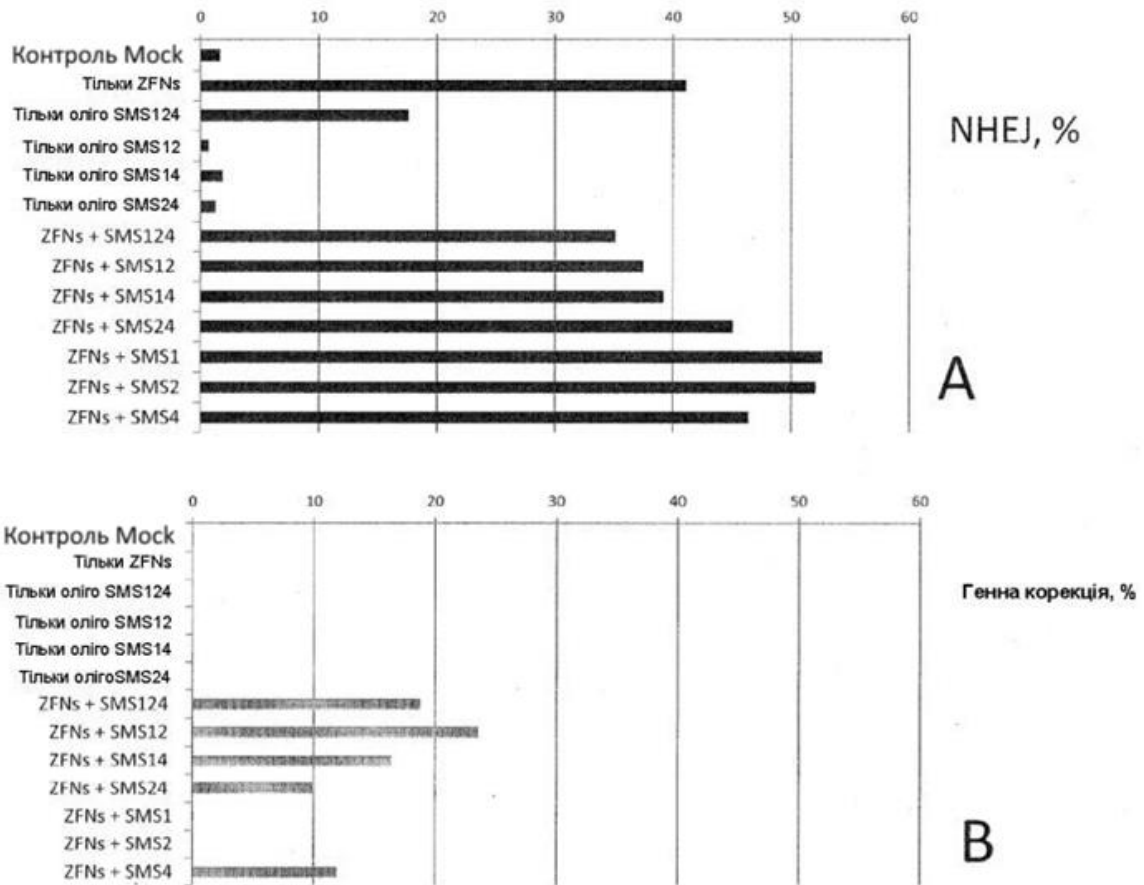
Фігура 7



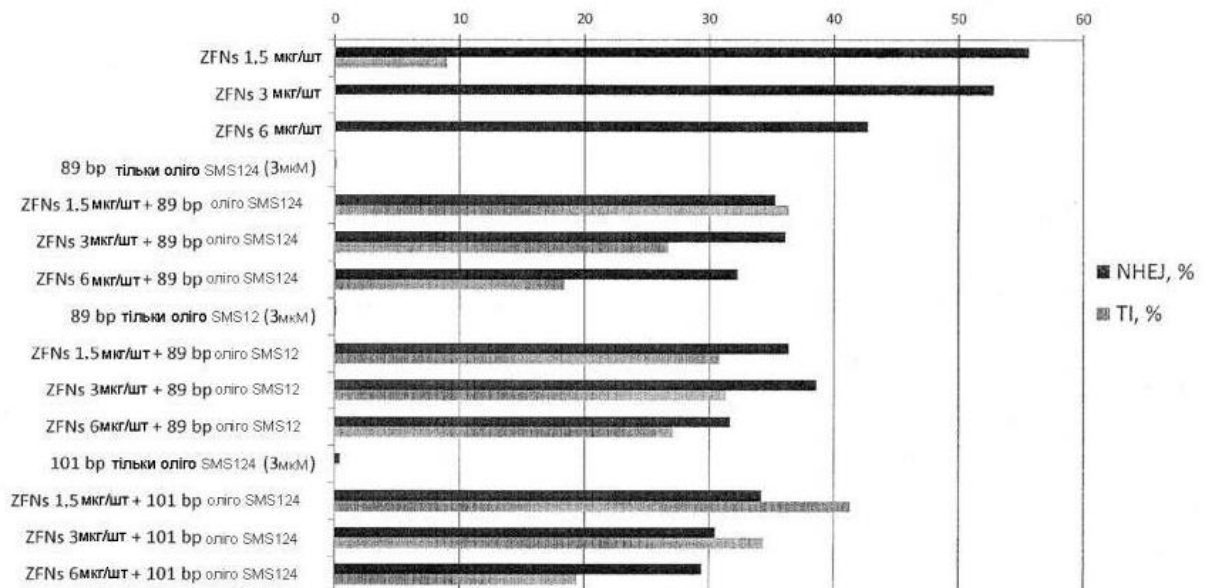
Фігура 8



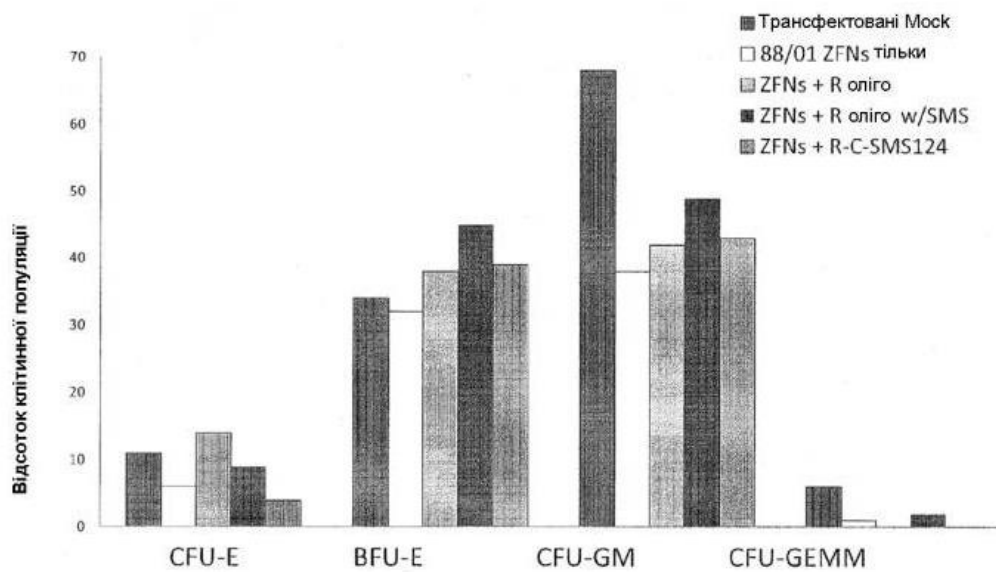
Фігура 9



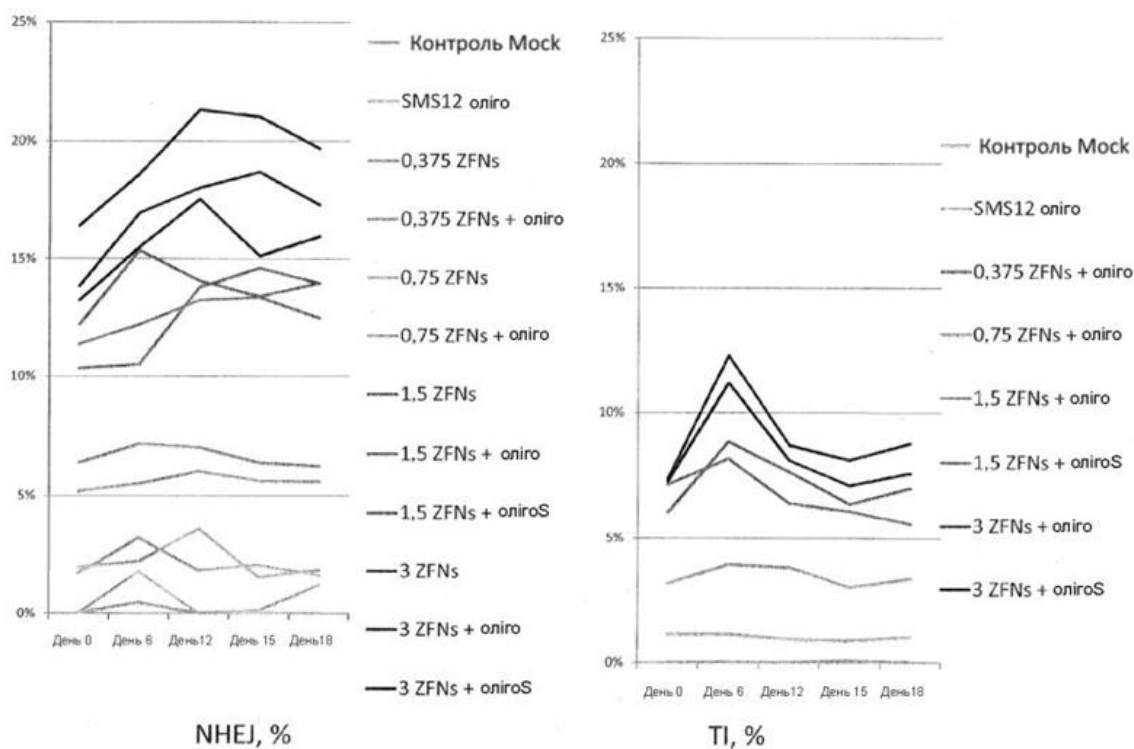
Фігура 10



Фігура 11



Фігура 12



Фігура 13

Комп'ютерна верстка Г. Паяльніков

Міністерство економічного розвитку і торгівлі України, вул. М. Грушевського, 12/2, м. Київ, 01008, Україна

ДП "Український інститут промислової власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601