

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **201990212** (13) **A1**

**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки  
**2020.09.07**

(22) Дата подачи заявки  
**2017.07.05**

(51) Int. Cl. *A61K 48/00* (2006.01)  
*A61K 38/46* (2006.01)  
*C12N 15/113* (2010.01)  
*C12N 9/16* (2006.01)  
*C12N 15/63* (2006.01)  
*C12N 15/85* (2006.01)  
*A61P 27/02* (2006.01)

---

**(54) КОМПОЗИЦИИ НА ОСНОВЕ СИСТЕМЫ CRISPR/CAS9 И СПОСОБЫ ЛЕЧЕНИЯ  
ДЕГЕНЕРАЦИЙ СЕТЧАТКИ**

---

(31) **62/358,337**

(32) **2016.07.05**

(33) **US**

(86) **PCT/US2017/040745**

(87) **WO 2018/009562 2018.01.11**

(71) Заявитель:

**ДЗЕ ДЖОНС ХОПКИНС  
ЮНИВЕРСИТИ (US)**

(72) Изобретатель:

**Джаскула-Ранга Винод, Зэк Дональд,  
Банз Фред, Велсби Дерек (US)**

(74) Представитель:

**Медведев В.Н. (RU)**

---

(57) В заявке описаны способы лечения у субъекта дегенерации сетчатки, такой как врожденный амавроз Лебера (LCA), пигментный ретинит (RP) и глаукома. Также здесь предусмотрены способы изменения экспрессии одного или более продуктов генов в клетке, такой как ганглиозная клетка сетчатки. Такие способы могут включать использование модифицированной нуклеазной системы, такой как система коротких палиндромных повторов, регулярно расположенных группами, (CRISPR), включающая двунаправленный промотор H1 и РНК-проводники (gRNA), направленные на гены, связанные с дегенерацией сетчатки, упакованная в одну компактную частицу аденоассоциированного вируса (AAV).

**A1**

**201990212**

**201990212**

**A1**

## ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-554579EA/032

### КОМПОЗИЦИИ НА ОСНОВЕ СИСТЕМЫ CRISPR/CAS9 И СПОСОБЫ ЛЕЧЕНИЯ ДЕГЕНЕРАЦИЙ СЕТЧАТКИ

#### ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА

Эта заявка притязает на приоритет предварительной заявки на патент США с № 62/358337, поданной 5 июля 2016 г., которая полностью включена в заявку посредством ссылки.

#### ПРЕДПОСЫЛКИ СОЗДАНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Дегенерации сетчатки представляют собой группу нарушений, которые включают, среди прочих, врожденный амавроз Лебера (LCA), пигментный ретинит (RP) и глаукому. LCA является наследственной формой дегенерации сетчатки, характеризующейся тяжелым нарушением функции сетчатки и серьезным ослаблением зрения серьезным ослаблением зрения в течение первых месяцев жизни. LCA представляет собой редкое (орфанное) заболевание (которое поражает менее 200000 американцев), но 18 подтипов LCA вместе являются самой распространенной причиной наследственной слепоты. Подтип, который обозначен LCA10, является самым распространенным подтипом, на который приходится >20% всех случаев LCA. Некоторые формы LCA поддаются лечению рекомбинантными аденоассоциированными вирусами (AAV), сконструированными для доставки функциональной копии дефектного клеточного гена. В 2008 году трансген, который комплементировал мутацию в RPE65, был успешно доставлен с помощью AAV пациентам с LCA2 в фазе I клинического испытания (Maguire AM et al. *N Engl J Med.* 2008; 358(21): 2240-2248). Были отмечены некоторые ответные реакции, но они не были длительными, поскольку экспрессия трансгена в конечном итоге была утрачена (Schimmer J et al. *Hum Gene Ther Clin Dev.* 2015; 26(4): 208-210; Azvolinsky A. *Nat Biotechnol.* 2015; 33(7): 678-678). Кроме того, некоторые из генов, которые вызывают различные подтипы LCA, просто слишком велики для доставки с помощью AAV. По этой причине эти подтипы LCA остаются неизлечимыми.

ADRP (аутосомно-доминантная форма пигментного ретинита) составляет приблизительно 30-40% от всех случаев RP, и среди

пациентов с ADRP наиболее часто мутировавшим геном, ассоциированным с RP, является тот, который кодирует родопсин зрительного пигмента палочек (Dryja, T. P. *et al.* *The New England journal of medicine* 323, 1302-1307 (1990); Dryja, T. P. *et al.* *Nature* 343, 364-366 (1990)). В настоящее время не существует одобренных FDA (Управлением по контролю за продуктами и лекарственными средствами) способов лечения пациентов с ADRP; однако разрабатывается ряд подходов. Большинство из этих подходов является вариациями на тему «супрессия и замена». При таком подходе снижают экспрессию гена, ответственного за дегенерацию, например, снижают уровни РНК для родопсина с помощью рибозима или посредством РНК-интерференции (RNAi) (исследуются методики с использованием как shRNA (коротких шпилечных РНК), так и siRNA (коротких интерферирующих РНК)), а затем экспрессию эндогенных аллелей замещают «закаленным» геном, который не подвержен нокдауну с помощью рибозима или агента для РНК-интерференции. Возможно, наиболее близкой к клиническому применению вариацией на эту тему является агент RhoNova, разработанный Genable Technologies Limited. RhoNova использует siRNA для снижения экспрессии эндогенного родопсина (как мутантного, так и дикого типа) в сочетании с доставляемой с помощью AAV кДНК, которая кодирует модифицированный, но функциональный родопсин, который не подвержен нокдауну с помощью siRNA (<http://www.genable.net>).

Глаукома, ведущая причина необратимой слепоты во всем мире (Levkovitch-Verbin H *et al.* *iovsorg* 44, 3388-3393 (2003)), представляет собой нейропатию зрительного нерва, при которой прогрессирующее повреждение аксонов ганглиозных клеток сетчатки (RGC) в решетчатой пластине головки зрительного нерва приводит к дегенерации аксонов и гибели клеток (Howell GR *et al.* *J Cell Biol* 179, 1523-1537 (2007)). В настоящее время единственное лечение, будь то глазные капли, лазеры или хирургическое вмешательство, заключается в снижении внутриглазного давления (ВГД) и уменьшении повреждения головки зрительного нерва. К сожалению, это трудно для некоторых пациентов, тогда как у других пациентов болезнь может продолжать ухудшаться, несмотря

на активное снижение ВГД. В этой области уже давно нужна альтернативная терапевтическая стратегия, которая могла бы дополнить снижение ВГД путем ослабления реакции RGC на остаточное повреждение аксонов. Более того, NEI включил регенерацию зрительного нерва в число своих инновационных целей, и любая регенеративная терапия обязательно должна решать проблему выживаемости аксотомизированных (с раздвоением аксонов) RGC. В связи с этим существует огромная потребность в разработке нейропротективного средства, которое могло бы непосредственно вмешиваться в активные генетические программы дегенерации аксонов RGC и/или гибели клеток, связанной с повреждением аксонов (Adalbert R et al. *Science* (2012), doi:10.1126/science.1223899; Yang J et al. *Cell* 160, 161-176 (2015); Welsbie DS et al. *Proc Nat Acad Sci USA* 110, 4045-4050 (2013); Watkins TA et al. *Proc Nat Acad Sci USA* 110, 4039-4044 (2013)).

Таким образом, существует огромная потребность в новых и улучшенных способах лечения дегенераций сетчатки, таких как LCA, ADRP и глаукома.

#### **КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ СУЩНОСТИ НАСТОЯЩЕГО ИЗОБРЕТЕНИЯ**

При осуществлении настоящего изобретения обычно используются, если не указано иное, традиционные методы клеточной биологии, культивирования клеток, молекулярной биологии, трансгенной биологии, микробиологии, технологии рекомбинантных нуклеиновых кислот (например, ДНК), иммунологии и РНК-интерференции (RNAi), которые находятся в пределах компетентности в данной области техники. Неограничивающие описания некоторых из этих методов содержатся в следующих публикациях: Ausubel, F., et al., (eds.), *Current Protocols in Molecular Biology*, *Current Protocols in Immunology*, *Current Protocols in Protein Science*, and *Current Protocols in Cell Biology*, all John Wiley & Sons, N.Y., edition as of December 2008; Sambrook, Russell, and Sambrook, *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, 3<sup>rd</sup> ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 2001; Harlow, E. and Lane, D., *Antibodies-A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold

Spring Harbor, 1988; Freshney, R. I., "Culture of Animal Cells, A Manual of Basic Technique", 5th ed., John Wiley & Sons, Hoboken, N.J., 2005. Неограничивающая информация относительно терапевтических средств и заболеваний человека содержится в Goodman and Gilman: The Pharmacological Basis of Therapeutics, 11th Ed., McGraw Hill, 2005, Katzung, B. (ed.) Basic and Clinical Pharmacology, McGraw-Hill/Appleton & Lange 10<sup>th</sup> ed. (2006) или 11-ом издании (июль 2009). Неограничивающая информация относительно генов и генетических нарушений содержится в McKusick, V. A.: Mendelian Inheritance in Man. A Catalog of Human Genes and Genetic Disorders. Baltimore: Johns Hopkins University Press, 1998 (12-е издание) или более поздней оперативной базе данных: Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM™. McKusick-Nathans Institute of Genetic Medicine, Johns Hopkins University (Baltimore, Md.) and National Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine (Bethesda, Md.), по состоянию на 1 мая 2010 года, доступной в всемирной сети Интернет: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/> и в Online Mendelian Inheritance in Animals (OMIA), базе данных генов, наследственных нарушений и признаков у видов животных (кроме человека и мыши), доступной в всемирной сети Интернет: <http://omia.angis.org.au/contact.shtml>. Все патенты, заявки на патенты и другие публикации (например, научные статьи, книги, веб-сайты и базы данных), упомянутые здесь, включены посредством ссылки во всей их полноте. В случае противоречия между описанием настоящего изобретения и любой из включенных ссылок должно главенствовать описание настоящего изобретения (включая любые его изменения, которые могут быть основаны на включенной ссылке). Здесь используются стандартные принятые в данной области техники значения терминов, если не указано иное. Здесь используются стандартные сокращения для различных терминов.

Здесь описаны способы лечения дегенераций сетчатки, таких как нейропатии зрительного нерва, включая врожденный амавроз Лебера (например, врожденный амавроз Лебера типа 10, обусловленный мутацией в CEP290 (LCA)), пигментный ретинит

(например, обусловленный мутациями R135 в гене родопсина) или глаукому. В этих способах используется модифицированная нуклеазная система, такая как короткие палиндромные повторы, регулярно расположенных группами (CRISPR) {например, связанный с CRISPR (Cas)9 (CRISPR-Cas9), не связанные с Cas9 системы CRISPR, система CRISPR-Cpf-1 и т.п.}, для расщепления и/или репарации геномной ДНК или РНК (например, система Cas13a/C2c2). Редактирование генов на основе системы CRISPR может использоваться для инактивации или корректирования мутаций генов, вызывающих нейропатии зрительного нерва и дегенерации сетчатки (например, вызывающих LCA мутаций и мутаций в гене родопсина), тем самым обеспечивая генно-терапевтический подход для этих групп заболеваний. В некоторых вариантах осуществления система CRISPR используется для введения мутации, которая будет инактивировать нормальный ген (например, DLK и/или LZK), вызывающий дегенерацию сетчатки (например, глаукому). Поскольку эти гены играют роль в чувствительности к повреждениям и выживаемости клеток, конечным результатом является выживание клеток. «Нейропротективный» подход не является взаимоисключающим подходом, так как существуют генетические мутации, которые также могут привести к глаукоме, и они будут такими же, как в случае дегенерации сетчатки. В некоторых вариантах осуществления мишени-мутации в случае глаукомы включают, но без ограничения ими, OPTN, TBK1, TMC01, PMM2, GMDS, GAS7, FNDC3B, TXNRD2, ATXN2, CAV1/CAV2, p16INK4a, SIX6, ABCA1, AFAP1 и CDKN2B-AS.

Таким образом, один аспект изобретения относится к способу лечения нарушения (например, дегенерации сетчатки), затрагивающего область сетчатки у субъекта, при этом способ включает введение в область сетчатки субъекта терапевтически эффективного количества нуклеазной системы, включающей нацеленную на геном нуклеазу и ДНК-проводник, включающий по меньшей мере одну последовательность, нацеленную на геном.

В другом аспекте настоящего изобретения предусматриваются способы лечения дегенераций сетчатки с использованием композиции, содержащей модификацию не встречающейся в природе системы CRISPR, ранее описанной в WO 2015/195621 (полностью

включенной сюда посредством ссылки). В случае такой модификации используются определенные РНК-проводники, которые нацелены на связанные с дегенерацией сетчатки гены, такие как, но без ограничения ими, вызывающий LCA10 ген CEP290, родопсин, киназа с двойной лейциновой застежкой-молнией (DLK), киназа с лейциновой застежкой-молнией (LZK), JNK1-3, MKK4, MKK7, ATF2, JUN, MEK2A, SOX11 или PUMA. В некоторых вариантах осуществления композиция содержит (а) не встречающуюся в природе нуклеазную систему (например, CRISPR), включающую один или более векторов, включающих: i) промотор (например, двунаправленный промотор H1), функционально связанный с по меньшей мере одной нуклеотидной последовательностью, кодирующей РНК-проводник (gRNA) нуклеазной системы, причем gRNA гибридизуется с последовательностью-мишенью молекулы ДНК в клетке субъекта, и причем молекула ДНК кодирует один или более продуктов генов, экспрессируемых в клетке; и ii) действующий в клетке регуляторный элемент, функционально связанный с нуклеотидной последовательностью, кодирующей нацеленную на геном нуклеазу (например, белок Cas9), причем компоненты (i) и (ii) расположены в одном и том же или разных векторах системы, причем gRNA нацеливается (таргетирует) и гибридизуется с последовательностью-мишенью, а нуклеаза расщепляет молекулу ДНК с изменением экспрессии одного или более продуктов генов. В некоторых вариантах осуществления система упакована в одну частицу аденоассоциированного вируса (AAV). В некоторых вариантах осуществления промотор включает: а) контрольные элементы, которые обеспечивают транскрипцию в одном направлении по меньшей мере одной нуклеотидной последовательности, кодирующей gRNA; и б) контрольные элементы, которые обеспечивают транскрипцию в противоположном направлении нуклеотидной последовательности, кодирующей нацеленную на геном нуклеазу.

В другом аспекте настоящего изобретения предусматриваются способы изменения экспрессии одного или более продуктов генов в эукариотической клетке, причем клетка включает молекулу ДНК, кодирующую один или более продуктов генов, при этом способ включает введение в клетку модифицированной не встречающейся в

природе системы CRISPR, ранее описанной в WO 2015/195621 (полностью включенной сюда посредством ссылки). В случае такой модификации используются определенные РНК-проводники, которые нацелены на связанные с дегенерацией сетчатки гены, такие как, но без ограничения ими, вызывающий LCA10 ген CEP290, родопсин, киназа с двойной лейциновой застежкой-молнией (DLK), киназа с лейциновой застежкой-молнией (LZK), JNK1-3, MKK4, MKK7, ATF2, JUN, MEF2A, SOX11 или PUMA. В некоторых вариантах осуществления способ включает введение в клетку композиции, содержащей (а) не встречающуюся в природе нуклеазную систему (например, CRISPR), включающую один или более векторов, включающих: i) промотор (например, двунаправленный промотор H1), функционально связанный с по меньшей мере одной нуклеотидной последовательностью, кодирующей РНК-проводник (gRNA) нуклеазной системы, причем gRNA гибридизуется с последовательностью-мишенью молекулы ДНК в клетке субъекта, и причем молекула ДНК кодирует один или более продуктов генов, экспрессируемых в клетке; и ii) действующий в клетке регуляторный элемент, функционально связанный с нуклеотидной последовательностью, кодирующей нацеленную на геном нуклеазу (например, белок Cas9), причем компоненты (i) и (ii) расположены в одном и том же или разных векторах системы, причем gRNA нацеливается и гибридизуется с последовательностью-мишенью, а нуклеаза расщепляет молекулу ДНК с изменением экспрессии одного или более продуктов генов. В некоторых вариантах осуществления система упакована в одну частицу аденоассоциированного вируса (AAV). В некоторых вариантах осуществления промотор включает: а) контрольные элементы, которые обеспечивают транскрипцию в одном направлении по меньшей мере одной нуклеотидной последовательности, кодирующей gRNA; и б) контрольные элементы, которые обеспечивают транскрипцию в противоположном направлении нуклеотидной последовательности, кодирующей нацеленную на геном нуклеазу.

Один аспект настоящего изобретения относится к способу лечения дегенерации сетчатки у нуждающегося в этом субъекта, при этом способ включает: (а) обеспечение не встречающейся в природе нуклеазной системы, включающей один или более векторов,

включающих: i) промотор, функционально связанный с по меньшей мере одной нуклеотидной последовательностью, кодирующей РНК-проводник (gRNA) нуклеазной системы, причем gRNA гибридизуется с последовательностью-мишенью молекулы ДНК в клетке субъекта, и причем молекула ДНК кодирует один или более продуктов генов, экспрессируемых в клетке; и ii) действующий в клетке регуляторный элемент, функционально связанный с нуклеотидной последовательностью, кодирующей нацеленную на геном нуклеазу, причем компоненты (i) и (ii) расположены в одном и том же или в разных векторах системы, причем gRNA нацеливается и гибридизуется с последовательностью-мишенью, а нуклеаза расщепляет молекулу ДНК с изменением экспрессии одного или более продуктов генов; и (b) введение в область сетчатки субъекта терапевтически эффективного количества системы.

В некоторых вариантах осуществления система представляет собой CRISPR.

В некоторых вариантах осуществления система упакована в одну частицу аденоассоциированного вируса (AAV).

В некоторых вариантах осуществления система инактивирует один или более продуктов генов.

В некоторых вариантах осуществления нуклеазная система вырезает по меньшей мере одну мутацию в гене.

В некоторых вариантах осуществления промотор включает двунаправленный промотор. В некоторых вариантах осуществления промотор включает нуклеотидную последовательность, идентичную на по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% или 100% нуклеотидной последовательности, выбираемой из группы, состоящей из SEQ ID NO:739-787. В некоторых вариантах осуществления промотор включает нуклеотидную последовательность, выбираемую из группы, состоящей из SEQ ID NO:739-787.

В некоторых вариантах осуществления двунаправленный промотор представляет собой H1 (SEQ ID NO:787). Промотор H1 является промотором как для полимеразы (pol) II, так и для полимеразы III. В некоторых вариантах осуществления промотор ортологичен промотору H1.

В некоторых вариантах осуществления ортологичный промотор

H1 происходит от плацентарных млекопитающих.

В некоторых вариантах осуществления ортологичный промотор H1 происходит от *Ailuropoda melanoleuca*, *Bos taurus*, *Callithrix jacchus*, *Canis familiaris*, *Cavia porcellus*, *Chlorocebus sabaeus*, *Choloepus hoffmanni*, *Dasypus novemcinctus*, *Dipodomys ordii*, *Equus caballus*, *Erinaceus europaeus*, *Felis catus*, *Gorilla gorilla*, *Homo sapiens*, *Ictidomys tridecemlineatus*, *Loxodonta africana*, *Macaca mulatta*, *Mus musculus*, *Mustela putorius furo*, *Myotis lucifugus*, *Nomascus Leucogenys*, *Ochotona princeps*, *Oryctolagus cuniculus*, *Otolemur garnettii*, *Ovis aries*, *Pan troglodytes*, *Papio anubis*, *Pongo abelii*, *Procavia capensis*, *Pteropus vampyrus*, *Rattus norvegicus*, *Sus scrofa*, *Tarsius syrichta*, *Tupaia belangeri*, *Tursiops truncatus*, *Vicugna pacos*.

В некоторых вариантах осуществления ортологичный промотор H1 происходит от мыши или крысы.

В некоторых вариантах осуществления ортологичный промотор H1 включает нуклеотидную последовательность, идентичную на по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% или 100% нуклеотидной последовательности, представленной в SEQ ID NO:752-786.

В некоторых вариантах осуществления ортологичный промотор H1 включает нуклеотидные последовательности, представленные в группе, состоящей из SEQ ID NO:752-786.

В некоторых вариантах осуществления промотор H1 включает:  
а) контрольные элементы, которые обеспечивают транскрипцию в одном направлении по меньшей мере одной нуклеотидной последовательности, кодирующей gRNA; и б) контрольные элементы, которые обеспечивают транскрипцию в противоположном направлении нуклеотидной последовательности, кодирующей нацеленную на геном нуклеазу.

В некоторых вариантах осуществления нацеленной на геном нуклеазой является белок Cas9. В некоторых вариантах осуществления белок Cas9 является оптимизированным в отношении частоты использования кодонов для экспрессии в клетке.

В некоторых вариантах осуществления промотор функционально связан с по меньшей мере одной, двумя, тремя, четырьмя, пятью,

шестью, семью, восемью, девятью или десятью gRNA.

В некоторых вариантах осуществления область сетчатки представляет собой сетчатку.

В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой фоторецепторную клетку сетчатки.

В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой ганглиозную клетку сетчатки.

В некоторых вариантах осуществления дегенерацию сетчатки выбирают из группы, состоящей из врожденного амавроза Лебера (LCA), пигментного ретинита (RP) и глаукомы.

В некоторых вариантах осуществления дегенерация сетчатки представляет собой LCA1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 или 18.

В некоторых вариантах осуществления дегенерация сетчатки представляет собой LCA10.

В некоторых вариантах осуществления последовательность-мишень находится в вызывающем LCA10 гене CEP290.

В некоторых вариантах осуществления последовательность-мишень представляет собой мутацию в гене CEP290.

В некоторых вариантах осуществления последовательность-мишень выбирают из группы, состоящей из нуклеотидных последовательностей, представленных в SEQ ID NO:1-109, 164-356, 735-738, или их комбинаций.

В некоторых вариантах осуществления последовательность-мишень включает SEQ ID NO:1, 2, 3 и 4, функционально связанные.

В некоторых вариантах осуществления вектор включает нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 110.

В некоторых вариантах осуществления дегенерация сетчатки представляет собой аутосомно-доминантную форму пигментного ретинита (ADRP).

В некоторых вариантах осуществления один или более продуктов генов представляют собой родопсин.

В некоторых вариантах осуществления последовательность-мишень представляет собой мутацию в гене родопсина.

В некоторых вариантах осуществления последовательность-

мишень представляет собой мутацию в R135 гена родопсина.

В некоторых вариантах осуществления мутацию в R135 выбирают из группы, состоящей из R135G, R135W, R135L.

В некоторых вариантах осуществления последовательность-мишень выбирают из группы, состоящей из нуклеотидных последовательностей, представленных в SEQ ID NO:111-126, или их комбинаций.

В некоторых вариантах осуществления последовательность gRNA выбирают из группы, состоящей из нуклеотидных последовательностей, представленных в SEQ ID NO: 127-142, или их комбинаций.

В некоторых вариантах осуществления дегенерация сетчатки представляет собой глаукому.

В некоторых вариантах осуществления один или более продуктов генов представляют собой киназу с двойной лейциновой застежкой-молнией (DLK), киназу с лейциновой застежкой-молнией (LZK), ATF2, JUN, SRY-box 11 (ответственную за определение пола область Y-хромосомы-бокс 11) (SOX11), миоцит-специфический энхансерный фактор 2A (MEF2A), JNK1-3, MKK4, MKK7, SOX11 или PUMA, или их комбинации.

В некоторых вариантах осуществления один или более продуктов генов являются членами пути с участием DLK/LZK, MKK4/7, JNK1/2/3 или SOX11/ATF2/JUN/MEF2A.

В некоторых вариантах осуществления последовательность-мишень выбирают из группы, состоящей из нуклеотидных последовательностей, представленных в SEQ ID NO:143-163, или их комбинаций.

В некоторых вариантах осуществления введение субъекту происходит путем имплантации, инъекции или вирусного воздействия.

В некоторых вариантах осуществления введение субъекту происходит путем субретинальной инъекции.

В некоторых вариантах осуществления субъектом является человек.

Другой аспект настоящего изобретения относится к способу изменения экспрессии одного или более продуктов генов в клетке,

причем клетка включает молекулу ДНК, кодирующую один или более продуктов генов, при этом способ включает введение в клетку не встречающейся в природе нуклеазной система, включающей один или более векторов, включающих: а) промотор, функционально связанный с по меньшей мере одной нуклеотидной последовательностью, кодирующей РНК-проводник (gRNA) нуклеазной системы, причем gRNA гибридизуется с последовательностью-мишенью молекулы ДНК; и б) действующий в клетке регуляторный элемент, функционально связанный с нуклеотидной последовательностью, кодирующей нацеленную на геном нуклеазу, причем компоненты (а) и (б) расположены в одном и том же или в разных векторах системы, причем gRNA нацеливается и гибридизуется с последовательностью-мишенью, а нуклеаза расщепляет молекулу ДНК с изменением экспрессии одного или более продуктов генов.

В некоторых вариантах осуществления система представляет собой CRISPR.

В некоторых вариантах осуществления система упакована в одну частицу аденоассоциированного вируса (AAV).

В некоторых вариантах осуществления система инактивирует один или более продуктов генов.

В некоторых вариантах осуществления нуклеазная система вырезает по меньшей мере одну мутацию в гене.

В некоторых вариантах осуществления промотор представляет собой двунаправленный промотор.

В некоторых вариантах двунаправленным промотором является H1. Промотор H1 является промотором как для полимеразы (pol) II, так и для полимеразы III.

В некоторых вариантах осуществления промотор H1 включает: а) контрольные элементы, которые обеспечивают транскрипцию в одном направлении по меньшей мере одной нуклеотидной последовательности, кодирующей gRNA; и б) контрольные элементы, которые обеспечивают транскрипцию в противоположном направлении нуклеотидной последовательности, кодирующей нацеленную на геном нуклеазу.

В некоторых вариантах осуществления нацеленной на геном нуклеазой является Cas9.

В некоторых вариантах осуществления белок Cas9 является оптимизированным в отношении частоты использования кодонов для экспрессии в клетке.

В некоторых вариантах осуществления промотор функционально связан с по меньшей мере одной, двумя, тремя, четырьмя, пятью, шестью, семью, восемью, девятью или десятью gRNA.

В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой эукариотическую или неэукариотическую клетку.

В некоторых вариантах осуществления эукариотическая клетка представляет собой клетку млекопитающего или человека.

В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой фоторецепторную клетку сетчатки.

В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой ганглиозную клетку сетчатки.

В некоторых вариантах осуществления один или более продуктов генов представляют собой вызывающий LCA10 ген CEP290.

В некоторых вариантах осуществления последовательность-мишень выбирают из группы, состоящей из нуклеотидных последовательностей, представленных в SEQ ID NO:1-109, 164-356, 735-738, или их комбинации.

В некоторых вариантах осуществления последовательность-мишень включает SEQ ID NO:1, 2, 3 и 4, функционально связанные.

В некоторых вариантах осуществления вектор включает нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO:110.

В некоторых вариантах осуществления один или более продуктов генов представляют собой родопсин.

В некоторых вариантах осуществления последовательность-мишень представляет собой мутацию в гене родопсина.

В некоторых вариантах осуществления последовательность-мишень представляет собой мутацию в R135 гена родопсина.

В некоторых вариантах осуществления мутацию в R135 выбирают из группы, состоящей из R135G, R135W, R135L.

В некоторых вариантах осуществления последовательность-мишень выбирают из группы, состоящей из нуклеотидных последовательностей, представленных в SEQ ID NO:111-126, или их комбинаций.

В некоторых вариантах осуществления последовательность gRNA выбирают из группы, состоящей из нуклеотидных последовательностей, представленных в SEQ ID NO:127-142, или их комбинаций.

В некоторых вариантах осуществления один или более продуктов генов представляют собой киназу с двойной лейциновой застежкой-молнией (DLK), киназу с лейциновой застежкой-молнией (LZK), ATF2, JUN, SRY-бокс 11 (ответственную за определение пола область Y-хромосомы-бокс 11) (SOX11), миоцит-специфический энхансерный фактор 2A (MEF2A), JNK1-3, MKK4, MKK7, SOX11 или PUMA, или их комбинации.

В некоторых вариантах осуществления один или более продуктов генов являются членами пути с участием DLK/LZK, MKK4/7, JNK1/2/3 или SOX11/ATF2/JUN/MEF2A.

В некоторых вариантах осуществления последовательность-мишень выбирают из группы, состоящей из нуклеотидных последовательностей, представленных в SEQ ID NO:143-163, или их комбинаций.

В некоторых вариантах осуществления снижается экспрессия одного или более продуктов генов.

Выше были изложены некоторые аспекты раскрываемого сейчас предмета изобретения, которые полностью или частично рассмотрены через раскрываемый сейчас предмет изобретения, другие аспекты станут очевидными по мере продолжения описания, если рассматривать его в сочетании с сопроводительными примерами и фигурами, которые лучше всего описаны здесь ниже.

#### **КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ФИГУР**

Описав таким образом раскрываемый сейчас предмет изобретения в общих чертах, теперь будет сделана ссылка на сопроводительные фигуры, которые необязательно выполнены в масштабе, и на которых:

Фиг. 1 демонстрирует платформенную технологию. Геномная последовательность двунаправленного промотора H1 с транскриптом pol II показана синим цветом, а с транскриптом pol III - оранжевым цветом (слева). Упаковка spCas9 и gRNA в один AAV вектор (справа).

Фиг. 2 демонстрирует доставку AAV-H1-CRISPR в сетчатку мыши. Вирус, сконструированный для экспрессии GFP вместо Cas9, демонстрирует как эффективную, так и специфическую трансдукцию мышечных фоторецепторов во внешнем ядерном слое (ONL) после субретинальной инъекции. Это клетки с мутациями, вызывающими LCA.

На фиг. 3 представлена иллюстрация подхода с использованием никазы Cas9, который требует наличия двух близко расположенных друг против друга сайтов-мишеней (L и R) на противоположных цепях.

Фиг. 4 демонстрирует мутацию, вызывающую LCA10. Четыре идентифицированных сайта для gRNA, которые могут привести к делеции размером ~1 т.о., удаляя криптоический экзон X из CEP290.

Фиг. 5 демонстрирует текущий подход с использованием SaCas9, обеспечивающий доставку 2 gRNA с использованием 4550 п.о., (слева) по сравнению с компактной системой H1, доставляющей 4 gRNA с использованием 4335 п.о. (справа). Пакующая емкость AAV указана пунктирной линией.

Фиг. 6 демонстрирует все сайты для SaCas9 (1 т.о. 5' (выше) и 1 т.о. 3' (ниже) от мутации в CEP290).

Фиг. 7 демонстрирует сайты для SaCas9, доступные для нацеливания (таргетинга) (все начинаются с 5'G).

Фиг. 8 демонстрирует более безопасный подход с использованием никазы SaCas9.

Фиг. 9 демонстрирует делецию (1078 п.о.) с помощью никазы SaCas9.

Фиг. 10 демонстрирует потенциальные сайты для SpCas9.

Фиг. 11 демонстрирует количество CRISPR-сайтов для SaCas9 или SpCas9 с 5'-нуклеотидом в области-мишени CEP290 (LCA10).

Фиг. 12 демонстрирует клонированную конструкцию SaCas9 размером ~4,2 т.о. с четырьмя gRNA.

Фиг. 13 демонстрирует структуру гена родопсина.

Фиг. 14 демонстрирует спектр мутаций гена RHO во всем мире (из <http://www.hindawi.com/journals/bmri/2014/302487/>)

Фиг. 15 демонстрирует мутацию Arg135 родопсина.

На фиг. 16 представлена родословная 2 французских семей с R135W (от Audo I *et al.* *Invest Ophthalmol Vis Sci.* (2010) Jul;51(7):3687-700).

Фиг. 17 демонстрирует R135W из сицилийской родословной с представлением 5 поколений (от Pannarale MR *et al.* *Ophthalmology.* (1996) Sep;103(9):1443-52).

Фиг. 18 демонстрирует шведскую семью шестого поколения с R135L (от Andréasson S *et al.* *Ophthalmic Paediatr Genet.* (1992) Sep;13(3):145-53).

Фиг. 19 демонстрирует, что скрининг кинома с повышенной чувствительностью идентифицирует LZK как взаимодействующую с DLK для способствования гибели клеток RGC.

Фиг. 20 демонстрирует, что скрининги siRNA, нацеленных на весь геном, идентифицируют ATF2, SOX11 и MEF2A в качестве медиаторов гибели клеток RGC.

Фиг. 21 демонстрирует нижерасположенные (расположенные после LZK/DLK) медиаторы LZK/DLK-зависимой гибели клеток RGC.

Фиг. 22 демонстрирует, что чувствительный к кальцию мотив в LZK не является токсичным.

Фиг. 23 демонстрирует слияния рибозим типа Hammerhead-sgRNA для увеличения числа таргетируемых spCas9 сайтов.

Фиг. 24 показывает, что скрининг сетей siRNA и siPOOL имеет увеличенную чувствительность и специфичность.

Фиг. 25 демонстрирует, что промотор H1 обеспечивает двунаправленную экспрессию транскриптов Pol II и Pol III.

Фиг. 26 демонстрирует количественную оценку RGC на основе проточной цитометрии.

Фиг. 27 демонстрирует нацеливание CRISPR на экзон 1 (А) и экзона 2 (В) DLK *in vitro*. Экзон 1 и экзон 2 DLK с сайтами-мишенями показаны синим цветом, а праймеры с сайтами для T7E1 показаны зеленым цветом.

Фиг. 28 содержит две панели, А и В, на которых показано нацеливание CRISPR на DLK *in vitro*. Фиг. 28А демонстрирует скрининг gRNA на их способность нацеливаться на ген DLK мыши. Номенклатура сайтой-мишеней соответствует <http://crispr.technology>. Фиг. 28В демонстрирует расщепление *in*

*vitro* с использованием двунаправленного промотора для экспрессии Cas9, а gRNA демонстрирует эффективное нацеливание на локус DLK. Контролем является трансфекция стандартными двумя плазмидами для Cas9 и gRNA. На фиг. 28В представлены эксперименты, в которых проверяется способность управлять как Cas9, так и gRNA с двунаправленного промотора H1. Клетки в культуре трансфицировали либо стандартными двумя плазмидами (Cas9 и gRNA), либо одной плазмидой с использованием двунаправленного промотора H1. Анализ с использованием T7E1 показывает сопоставимые уровни расщепления с использованием любой системы.

Фиг. 29 демонстрирует нацеливание на DLK посредством AAV *in vitro*.

Фиг. 30 содержит три панели, А, В и С, на которых представлена двунаправленная экспрессия в RGC *in vivo*. Фиг. 30А демонстрирует конструкцию, которая была упакована в AAV. На фиг. 30В показано, что на клеточную экспрессию GFP *in vivo* влияет используемый серотип AAV. Верхняя часть показывает предпочтительную экспрессию в фоторецепторах, а нижняя панель показывает предпочтительную экспрессию в RGC. Промотор H1, несомненно, экспрессирует GFP или в клетках фоторецепторов с доставкой с помощью AAV5, или в ганглиозных клетках сетчатки с помощью AAV2 (контроль). Оба вируса были доставлены с помощью субретинальной инъекции мышам в день P0,5. Оба с доставкой репортера, указанного на Фиг. 30А, с помощью субретинальной инъекции. Фиг. 30С демонстрирует экспрессию GFP в плоском срезе сетчатки через 15 дней после доставки в стекловидное тело конструкции репортера в AAV2.

Фиг. 31 содержит три панели А, В и С, демонстрирующих двунаправленное нацеливание с использованием самокомплементарных AAV вирусов. Фиг. 31А демонстрирует конструкцию самокомплементарного AAV, которая экспрессирует ядерный mCherry и gRNA с двунаправленного промотора. На этой фигуре, кроме того, представлены эксперименты, в которых проверяется возможность использования самокомплементарного AAV (scAAV) для доставки gRNA и флуоресцентного репортерного белка (H2B-mCherry). Клетки собирали от мыши, трансгенной по Cas9, и трансдуцировали *in*

*in vitro*. Преимущество scAAV заключается в возможности гораздо более быстрой проверки конструкции, поскольку экспрессия происходит через дни, а не недели. Фиг. 31А показывает, что конструкция была сконструирована с использованием промотора H1 для экспрессии gRNA (показана черным цветом) и mCherry одновременно. gRNA нацелена на ген DLK мыши, ген, который при инактивации приводит к увеличению выживаемости ганглиозных клеток сетчатки. Конструкция была упакована с получением самокомплементарного AAV (scAAV). Ганглиозные клетки сетчатки собирали от трансгенной по Cas9 мыши (которая коэкспрессирует GFP) и трансдуцировали scAAV вирусом; экспрессия mCherry была очевидна во всех клетках, экспрессирующих GFP, что указывает на высокоэффективную трансдукцию и экспрессию с конструкции. Фиг. 31А также демонстрирует проверку возможности использования самокомплементарного AAV (scAAV) для доставки gRNA и флуоресцентного репортерного белка (H2B-mCherry). Клетки собирали от трансгенной по Cas9 мыши и трансдуцировали *in vitro*. Преимущество scAAV заключается в возможности гораздо более быстрой проверки конструкций, поскольку экспрессия происходит через дни, а не недели. Фиг. 31В демонстрирует экспрессию *in vitro* репортера scAAV, трансдуцирующего RGC *in vitro*; экспрессия GFP от мыши, трансгенной по Cas9. Фиг. 31С демонстрирует высокоэффективное нацеливание (по существу) 100%, как обнаружено с помощью анализа с использованием BglII. GRNA (mm079) была доставлена с помощью ssAAV, и Cas9 присутствовал от мыши.

Фиг. 32 содержит пять панелей А-Е, демонстрирующих двунаправленное нацеливание с использованием самокомплементарных AAV вирусов. Титрование scAAV вируса, трансдуцирующего либо RGC WT, либо RGC, полученные из трансгенной по Cas9 мыши. Фиг. 32С показывает, что редактирование генома происходит в RGC, когда присутствует Cas9. Эти эксперименты *in vitro* демонстрируют очень высокие уровни (~100%) расщепления. В этом анализе проводился анализ расщепления по утрате сайта рестрикции. У животных WT продукт ПЦР полностью расщепляется BglII, однако у трансгенных по Cas9 мышей, трансдуцированных AAV, имеет место по существу

необнаружимое расщепление BglII в самой высокой концентрации, что указывает на ~100% расщепление CRISPR. Фиг. 32D и 32E демонстрируют восстановление *in vivo* ганглиозных клеток сетчатки после раздавливания зрительного нерва в подвергнутых лечению глазах. Конструкция была создана с использованием промотора H1 для экспрессии gRNA (показана черным цветом) и mCherry одновременно. GRNA нацелена на ген DLK мыши, ген, который при инактивации приводит к увеличению выживаемости ганглиозных клеток сетчатки. Конструкция была упакована с получением самокомплементарного AAV (scAAV). Вирус вводили в стекловидное тело трансгенной по Cas9 мыши или мыши WT в качестве контроля. Выживаемость ганглиозных клеток сетчатки определяли количественно через 14 дней после раздавливания зрительного нерва, что указывает на то, что доставка CRISPR приводила к выживанию RGC у подвергнутых лечению мышей по сравнению с контролем. (Обе мыши получают CRISPR-gRNA, но различие между мышами заключается в присутствии Cas9, который необходим для редактирования генома.)

Фиг. 33 содержит три панели, А, В и С, показывающих, что нацеливание CRISPR на DLK приводит к выживаемости RGC. Трансдукция RGC от мыши, трансгенной по Cas9, лентивирусом приводит к ~100% расщеплению, как определено с помощью анализа с использованием BglII. Разрушение DLK приводит к значительному увеличению выживаемости RGC, демонстрируя потенциал нацеливания на DLK в качестве терапевтической мишени при нейропатиях зрительного нерва.

Фиг. 34 содержит две панели, А и В, демонстрирующие нацеливание CRISPR на LZK *in vitro*. На фиг. 34А представлен экзон 1 LZK вместе с сайтами-мишенями, показанными синим, и праймерами с сайтами для T7E1, показанными зеленым. На фиг. 34В представлен экзон 2 LZK вместе с сайтами-мишенями, показанными синим, и праймерами с сайтами для T7E1, показанными зеленым.

Фиг. 35 содержит семь панелей А-Н, показывающих, что скрининг siRNA, нацеленных на кинон, с повышенной чувствительностью идентифицирует LZK в качестве медиатора гибели

клеток RGC *in vitro*. Фиг. 35А демонстрирует выживаемость  $Dlk^{f1/f1}$  RGC, трансдуцированных Cre-экспрессирующим или контрольным аденовирусом и подвергнутых культивированию в присутствии тозасертиба (1 мкМ) или носителя в качестве контроля. На фиг. 35В представлена гистограмма, показывающая нормированную выживаемость для всех 1869 siRNA в библиотеке кинома (трансфицированных в присутствии siRNA, нацеленной на *Dlk*). Стрелки показывают выживаемость для каждой из трех siRNA, нацеленных на *Lzk*. Фиг. 35С демонстрирует выживаемость RGC WT, трансфицированных контролем или siRNA, нацеленной на *Dlk*, в комбинации с одной из четырех независимых siRNA, нацеленных на *Lzk*, или контролем без нацеливания. Фиг. 35D демонстрирует капиллярный иммунологический анализ RGC WT после трансфекции контрольным siPOOL, siPOOL, нацеленными на *Dlk*, *Lzk* или как *Dlk*, так и *Lzk*. Фиг. 35Е демонстрирует выживаемость RGC WT, трансфицированных возрастающим количеством контроля, siPOOL, нацеленных на *Dlk*, *Lzk* или как *Dlk*, так и *Lzk*. Фиг. 35F демонстрирует выживаемость RGC WT, трансфицированных siRNA, нацеленной на *Dlk*, и либо контрольными siRNA, либо одной из четырех независимых siRNA, нацеленных на других членов семейства киназ смешанного происхождения. Фиг. 35G демонстрирует выживаемость RGC WT, трансфицированных контрольными siPOOL, siPOOL, нацеленными на *Dlk*, *Lzk* или как *Dlk*, так и *Lzk* и подвергнутых культивированию в присутствии возрастающих доз тозасертиба. На фиг. 35H представлена выживаемость ( $\pm$ SD (среднеквадратическое отклонение)) RGC WT, трансфицированных siPOOL, в присутствии или в отсутствие нейротрофинов (NT, 50 нг/мл BDNF, 5 нг/мл GDNF, 5 нг/мл CNTF), через два дня после добавления колхицина (1 мкМ). \* $P < 0,05$ , U-критерий Манна-Уитни. D/L, *Dlk/Lzk*.

Фиг. 36 содержит шесть панелей, А и F, на которых показано, что RGC с целенаправленной делецией *Dlk* и *Lzk* обладают высокой устойчивостью к гибели клеток, индуцируемой повреждением аксонов, *in vitro* и *in vivo*. На фиг. 36А представлена схема подхода, использованного для получения мышей с конститутивным и

условным нокаутом *Lzk*. Во вставке представлен блоттинг по Саузерну, подтверждающий присутствие единственной нацеливающей конструкции у гетерозиготных животных. На фиг. 36В представлен капиллярный иммуноанализ (наверху) и количественная оценка (внизу) RGC, выделенных от мышей WT в сравнение с *Lzk*<sup>-/-</sup> мышами, через 0 или 24 часа после повреждения при иммунопэннинге. Фиг. 36С демонстрирует основанное на проточной цитометрии определение количества выживших RGC, с приведением к контролю без повреждения, через две недели после раздавливания зрительного нерва или ложного контроля. NS, незначительный, U-критерий Манна-Уитни. На фиг. 36D представлен капиллярный иммуноанализ (вверху) и количественная оценка (внизу) RGC, выделенных от мышей WT и *Lzk*<sup>f1/f1</sup> мышей и трансдуцированных Cre-экспрессирующим или контрольным аденовирусом. Фиг. 36Е демонстрирует выживаемость WT, *Dlk*<sup>f1/f1</sup>, *Lzk*<sup>f1/f1</sup> или *Dlk*<sup>f1/f1</sup>*Lzk*<sup>f1/f1</sup> RGC, трансдуцированных возрастающими количествами либо Cre-экспрессирующего, либо контрольного аденовируса. Фиг. 36F демонстрирует основанное на проточной цитометрии определение количества выживших RGC, с приведением к контролю без повреждения, через две недели после раздавливания зрительного нерва или имитационного контроля. Во все глаза инъецировали 10<sup>9</sup> вирусных геномов AAV2-Cre за две недели до хирургического вмешательства. \*P < 0,05, U-критерий Манна-Уитни.

Фиг. 37 содержит пять панелей А-Е, на которых показано, что передача сигналов от LZK-киназы запускает гибель клеток RGC через каскад передачи сигналов от киназ MKK4/7 и JNK 1-3. Фиг. 37А демонстрирует выживаемость RGC WT, трансфицированных siPOOL, нацеленным на *Dlk/Lzk*, и затем восстанавливаемых с помощью передачи сигналов от LZK путем трансдукции аденовирусом, экспрессирующим WT или мутантную, устойчивую к siRNA кДНК для LZK человека. Фиг. 37В-С демонстрирует выживаемость WG (В-С), *Jnk1*<sup>f1/f1</sup>*Jnk2*<sup>-/-</sup>*Jnk3*<sup>-/-</sup> (В) или *Mkk4*<sup>f1/f1</sup>*Mkk7*<sup>f1/f1</sup> (С) RGC, трансдуцированных возрастающими количествами Cre-экспрессирующего или контрольного аденовируса. Фиг. 37D-Е демонстрирует выживаемость WT (D-E), *Jnk1*<sup>f1/f1</sup>*Jnk2*<sup>-/-</sup>*Jnk3*<sup>-/-</sup> (D) или *Mkk4*<sup>f1/f1</sup>*Mkk7*<sup>f1/f1</sup> (Е) RGC, трансфицированные siPOOL против

Dlk/Lzk, трансдуцированных Cre-экспрессирующим или контрольным аденовирусом, а затем, через два дня, восстанавливаемых с помощью передачи сигналов от LZK путем трансдукции аденовирусом, экспрессирующим кДНК для LZK человека, или контрольным аденовирусом.

Фиг. 38 содержит три панели А-С, показывающих, что скрининг siRNA, нацеленных на весь геном, идентифицирует ATF2, PUMA и MEF2A в качестве медиаторов гибели клеток RGC. На фиг. 38А представлена гистограмма, показывающая нормированную, скорректированную на затравочную последовательность выживаемость для медианы стимулирующей выживаемость siRNA, нацеленной на каждый из 17575 генов в библиотеке всего генома. Стрелки показывают выживаемость для медианы стимулирующей выживаемость siRNA, нацеленной на Atf2, Puma и Mef2a. На фиг. 38В представлена выживаемость RGC WT, трансфицированных одной из четырех независимых siRNA, нацеленных на Atf2, Puma или Mef2a, или контролем без нацеливания. Пунктирная линия показывает порог выживаемости, превышающий 3SD от отрицательного контроля. Фиг. 38С демонстрирует выживаемость RGC WT, трансфицированных возрастающим количеством контрольного siPOOL и siPOOL, нацеленного на Atf2 (слева), Puma (в центре) или Mef2a (справа).

Фиг. 39 содержит семь панелей А-Г, на которых показано, что RGC с целенаправленным разрушением регулирующих транскрипцию доменов ATF2 и MEF2A являются частично устойчивыми к индуцируемой повреждением аксонов гибели клеток *in vivo*. Фиг. 39А демонстрирует выживаемость RGC WT, трансфицированных siRNA, нацеленной на Dlk/Lzk или Puma, и трансдуцированных LZK WT или KD человека. На фиг. 39В представлен капиллярный иммуноанализ *Mef2a<sup>f1/f1</sup>* RGC, трансдуцированных Cre-экспрессирующим или контрольным аденовирусом. Фиг. 39С демонстрирует выживаемость WT или *Mef2a<sup>f1/f1</sup>* RGC, трансдуцированных возрастающим количеством Cre-экспрессирующего или контрольного аденовируса. На Фиг. 39D показано кратное изменение выживаемости при трансдукции *Mef2a<sup>f1/f1</sup>* в сравнение с *Mef2a<sup>f1/f1</sup>Mef2c<sup>f1/f1</sup>Mef2d<sup>f1/f1</sup>* RGC Cre-экспрессирующим или контрольным аденовирусом. Фиг. 39Е демонстрирует основанное на проточной цитометрии определение количества выживших RGC, с

приведением к контролю без повреждения, через две недели после раздавливания зрительного нерва или имитационного контроля. Во все глаза инъецировали  $10^9$  вирусных геномов AAV2-Cre за две недели до хирургического вмешательства. \* $P < 0,05$ , U-критерий Манна-Уитни. Фиг. 39F демонстрирует основанное на проточной цитометрии определение количества TUBB3/P-S408 MEF2A, выраженное в процентах от общего количества, через два дня после раздавливания зрительного нерва или имитационного контроля. Фиг. 39G демонстрирует выживаемость WT или *Atf2<sup>fl/fl</sup>* RGC, трансдуцированных возрастающим количеством Cre-экспрессирующего или контрольного аденовируса.

Фиг. 40 содержит шесть панелей A-G, показывающих, что скрининг siRNA, нацеленных на весь геном, с повышенной чувствительностью идентифицирует JUN и SOX11 в качестве медиаторов гибели клеток RGC. На фиг. 40A представлена гистограмма, показывающая нормированную выживаемость siRNA-минипула, нацеленного на каждый из генов в библиотеке всего генома (трансфицированной в присутствии siPOOL, нацеленного на Lzk). Стрелка показывает выживаемость для лучшего минипула siRNA, нацеленных на Dlk. На фиг. 40B представлен количественный анализ ПЦР (кПЦР) для мРНК для Sox11, с приведением к уровням GAPDH, в RGC WT в указанное время после повреждения при иммунопэннинге, которые были трансфицированы или контрольными siPOOL, или siPOOL, нацеленными на Dlk/Lzk или Sox11. Фиг. 40C демонстрирует выживаемость RGC WT, трансфицированных возрастающим количеством siPOOL, нацеленных на Lzk и/или Sox11. Фиг. 40D демонстрирует выживаемость RGC WT, трансфицированных siPOOL, нацеленными на Lzk или Lzk/Sox11, и восстановленных в отношении передачи сигналов от SOX11 путем трансдукции контрольным или экспрессирующим кДНК для SOX11 человека аденовирусом. Фиг. 40E демонстрирует выживаемость WT или *Sox11<sup>fl/fl</sup>* RGC, трансдуцированных возрастающим количеством Cre-экспрессирующего или контрольного аденовируса. Фиг. 40F демонстрирует основанное на проточной цитометрии определение количества выживших RGC, с приведением к контролю без повреждения, через две недели после раздавливания зрительного

нерва или имитационного контроля. Во все глаза инъецировали  $10^9$  вирусных геномов AAV2-Cre за две недели до хирургического вмешательства. \*P < 0,05, U-критерий Манна-Уитни. На фиг. 40G представлен анализ кПЦР мРНК для *Sox11*, с приведением к уровням GAPDH, в *Sox11fl/fl* RGC, трансдуцированных аденовирусом.

Фиг. 41 содержит семь панелей А-Н, показывающих, что DLK/LZK-зависимая гибель клеток опосредована совокупностью из четырех факторов транскрипции: JUN, ATF2, SOX11 и MEF2A. Фиг. 41А демонстрирует выживаемость RGC WT, трансфицированных указанными siPOOL. Фиг. 41В демонстрирует выживаемость RGC WT, трансфицированных siPOOL, нацеленными на *Dlk/Lzk*, и либо контрольными siPOOL, либо siPOOL, нацеленными на *Jun/Atf1/Sox11/Mef2a*, а затем восстановленных с помощью передачи сигналов от LZK путем трансдукции аденовирусом, экспрессирующим устойчивую к siRNA кДНК для LZK человека, или контрольным аденовирусом. Фиг. 41С демонстрирует выживаемость RGC WT или RGC с нокином SpCas9, трансфицированных siPOOL, нацеленным на *Lzk*, и либо *trancRNA*, либо *sgRNA*, нацеленными на *Dlk*. Фиг. 41D демонстрирует выживаемость RGC WT или RGC с нокином SpCas9, трансфицированных siPOOL, нацеленным на *Dlk*, и либо *tracrRNA*, либо *sgRNA*, нацеленными на *Lzk*. Фиг. 41Е демонстрирует выживаемость RGC WT или RGC с нокином SpCas9, трансфицированных отдельными *sgRNA* или пулами *sgRNA*, нацеленными на *Dlk* и/или *Lzk*. На фиг. 41F представлена нормированная выживаемость (SpCas9-WT), которая обеспечивается в результате трансфекции возрастающим количеством *sgRNA*, нацеленной на каждый из четырех факторов транскрипции (*Jun*, *Atf2*, *Sox11*, *Mef2a*), отдельно или в комбинации, и сравнивается с трансфекцией *tracrRNA* в качестве отрицательного контроля или *sgRNA*, нацеленными на *Dlk/Lzk*, в качестве положительного контроля. На фиг. 41Н представлена выживаемость ( $\pm$ SD) RGC с SpCas9, трансфицированных *sgRNA*, через два дня после трансдукции аденовируса для активации передачи сигналов от LZK. \*P < 0,05 по U-критерию Манна-Уитни для сравнения *sgRNA*, нацеленных на *Dlk/Lzk* и факторы транскрипции. На фиг. 41G представлена схема, демонстрирующая предполагаемый путь гибели

клеток RGC после повреждения аксона.

Фиг. 42 (имеющая отношение к фиг. 61) содержит 6 панелей А-Е, демонстрирующих, что LZK является медиатором гибели клеток в первичных RGC.

Фиг. 43 (имеющая отношение к фиг. 62) содержит 5 панелей А-Е, показывающих разработку анализа на основе проточной цитометрии для количественной оценки выживаемости RGC.

Фиг. 44 (имеющая отношение к фиг. 63) содержит 4 панели А-Д, показывающие результаты скрининга siRNA, нацеленных на весь геном.

Фиг. 45 (имеющая отношение к фиг. 64 и 65), содержит 8 панелей А-Н, показывающих, что нокдаун Mef2a, Puma и Atf2 и повреждение зрительного нерва приводят к DLK-зависимому фосфорилированию MEK2A.

Фиг. 46 (имеющая отношение к фиг. 66) содержит 5 панелей, А-Е, показывающих результаты скрининга siRNA, нацеленных на весь геном, с повышенной чувствительностью.

Фиг. 47 (имеющая отношение к фиг. 68) содержит 2 панели А-В, показывающих нокдаун с помощью CRISPR Dlk в первичных RGC.

Фиг. 48 содержит две панели А-В, на которых представлены графики выживаемости.

На фиг. 49 представлена таблица трассирующей РНК (trancRNA), mm190, mm204, mm094, mm079, mm936, mm926, mm375, mm775, mm878 и mm942.

Фиг. 50 демонстрирует размер конструкции AAV2 для нацеливания на CEP290. Размер конструкции составляет 4781 п.о. Промотором является двунаправленный промотор H1 (мышь). Терминатор для Pol II представляет собой SPA, а серотипом AAV является AAV2.

Фиг. 51 показывает, что LCA10 вызывается интронной мутацией в CEP290. Представлен ген CEP290. Мутация IVS26 с.2991+1655 А→G приводит к aberrantному сплайсингу и включению криптического экзона X размером 128 п.о. (внизу).

На фиг. 52 представлена геномная организация локуса H1RNA и PARP-2. Вверху представлено изображение гена PARP-2 (синего

цвета), транскрибируемого вправо, и гена H1RNA (оранжевого цвета), транскрибируемого влево, представленных в масштабе. Внизу приведена увеличенная область промоторной области для обоих генов.

На фиг. 53 представлены сайт-мишень для SpCas9 и мутация, вызывающая LCA10. Расположение мутации A→G указано во взаимосвязи с 3'-концом экзона X (оранжевый) и сайтом-мишенью для SpCas9 (синий). Сайт расщепления SpCas9 изображен двумя стрелками, а важные нуклеотиды для сплайсинга заключены в рамку.

На фиг. 54 представлены варианты SpCas9 с высокой точностью и высокой специфичностью. Точечные мутации eSpCas9 указаны синим цветом, а точечные мутации spCas9-HF 1 указаны оранжевым цветом.

На фиг. 55 представлен подход с использованием никазы Cas9. Для никазы требуются два близко расположенных друг против друга сайта-мишени (L и R; наверху) на противоположных цепях для создания двухцепочечного разрыва ДНК (внизу).

Фиг. 56 содержит три панели А-С, представляющие терапевтические средства CRISPR/AAV для LCA10. На фиг. 56А представлен рисунок AAV вируса и пакующая емкость. На фиг. 56В представлена схема конструкций для нацеливания SpCas9, которые включают варианты eSpCas9 и SpCas9-HF из SA1. На фиг. 56С представлена схема никазы SaCas9 с четырьмя gRNA, как описано в SA2.

Фиг. 57 содержит восемь панелей, А-Н. На фиг. 57А и 57В представлен геномный локус CEP290 с указанием расположения глубокой интронной мутации (A→G), вызывающей LCA10. Эта мутация вызывает включение криптического экзона (Exon X) в мРНК, что приводит к усеченному белку. Мутация A→G может стать мишенью CRISPR-Cas9, сайт который попадает на последовательность мутации. Ожидается, что нацеливание с помощью этой gRNA приведет к правильному сплайсингу, поскольку вставки/делеции, образуемые вокруг точки сплайсинга, могут нарушить сплайсинг этого псевдоэкзона. Внизу продемонстрирована общая стратегия нацеливания разрыва дцДНК на интронную область для восстановления нормальной экспрессии CEP290. На фиг. 57С

представлен нормальный ген CER290 (экзоны 25–28). На фиг. 57D представлена точечная мутация, которая затем приводит к включению криптоического экзона в CER290. На фиг. 57E и 57F представлена описанная стратегия попытки удаления последовательности точечной мутации, используя SaCas9 (поскольку она достаточно мала, чтобы поместиться в AAV). Эта стратегия ориентирована на удаление большей части интрона, чтобы удалить последовательность точечной мутации. Скорее всего, это связано с тем, что рядом с точечной мутацией нет сайтов для SaCas9. Эта стратегия использования SaCas9, скорее всего, будет иметь два последствия: (1) более низкую эффективность, поскольку требуются два расщепления ДНК вместо одного; (2) касающиеся безопасности проблемы, такие как хромосомные транслокации или реаранжировки, и возможность возникновения инсерционного мутагенеза, и (3) возможность для большего количества расщеплений вне мишени. И наоборот, используя двунаправленную стратегию, AAV может доставлять Cas9 (или варианты Cas9, или Cpf1, или варианты Cpf1), открывая доступ к гораздо большему количеству сайтов-мишеней и стратегий для восстановления нормального сплайсинга для CER290. На фиг. 57G и 57H представлено расщепление сайта нацеливания CER290, как определено по устойчивости к расщеплению BmrI после трансфекции плазмиды или трансдукции AAV вирусом.

На фиг. 58 показан размер конструкции AAV5 для нацеливания на родопсин *in vivo*. Размер конструкции составляет 4996 п.о. Промотором является двунаправленный промотор H1 (человека). Терминатор для Pol II является SV40. Серотипом AAV является AAV5.

Фиг. 59 содержит пять панелей А–Е, демонстрирующих двунаправленную экспрессию *in vivo* после инъекции в стекловидное тело. На фиг. 59А представлена валидация H1-двунаправленной промоторной конструкции *in vivo*. Как показано на фиг. 59А, была создана конструкция с использованием промотора H1, который использовался для экспрессии РНК (gRNA показана черным цветом) и GFP одновременно. GFP использовали для визуального считывания экспрессии pol II с промотора H1. Конструкцию, которая была фланкирована последовательностями ITR AAV, затем упаковывали в

вирус, используя тройную (Y444F+Y500F+Y730F) мутацию капсида AAV2\*, указанную \*, которая предпочтительнее для трансдукции ганглиозных клеток сетчатки. Вирус доставлялся путем инъекции в стекловидное тело; контрольная инъекция с использованием только носителя осуществлялась в контрольный глаз. Через 14 дней после инъекции мышь подвергали седативному действию, и визуализировали экспрессию GFP с использованием микроскопа для визуализации сетчатки Micro III. Диффузная экспрессия GFP может быть обнаружена у живой мыши, как показано на левой панели. Фиг. 59C демонстрирует отсутствие экспрессии GFP. Мышь подвергали эвтаназии, и экспрессию GFP визуализировали исходя из плоского среза сетчатки, что указывает на экспрессию GFP в слое ганглиозных клеток сетчатки, как и следовало ожидать с использованием серотипа AAV2\*. Фиг. 59C показывает, что двунаправленный промотор H1 был использован для экспрессии GFP (и пустой gRNA) и упакован или в AAV2, или в AAV5 вирус. Этот эксперимент предназначен для проверки экспрессии с H1 в разных типах клеток и для подтверждения тропизма к определенному типу клеток. На фиг. 59D представлена схематическая иллюстрация значения серотипов и тропизма. Серотипы относятся к различным «штаммам» AAV, а тропизм относится к типам клеток, которые данный штамм может инфицировать. Это свойство обеспечивает дополнительный уровень безопасности, так как конкретные серотипы могут использоваться для нацеливания на желаемые типы клеток. Например, в случае сетчатки серотипы AAV хорошо охарактеризованы и могут использоваться для преимущественного инфицирования определенных клеток, даже если они окружены множеством различных типов клеток. В частности, AAV5 демонстрирует специфичность в отношении фоторецепторов.

Фиг. 60 содержит две панели А-В, показывающих редактирование генома сетчатки с помощью CRISPR *in vivo* и стратегию нацеливания на доминантные аллели, используя SNP. Этот пример предназначен для нацеливания на мутацию P23H в родопсине. Нацеливание CRISPR на доминантную мутацию *in vivo* (P23H RHO) показано на фиг. 60B, на которой представлено использование SNP для аллельной специфичности и инактивация в цис-положении, и

использование сконструированных вариантов Cas9 для нацеливания на P23H. Слева показана схема селекции с использованием гомозиготной по P23H мыши на линии C57BL, скрещенной с инбредной линией мышей дикого типа CAST/EiJ. Линия CAST несет несинонимичный SNP, который отсутствует в других линиях, как показало секвенирование. Этот SNP не изменяет последовательность белка родопсина WT и может использоваться для различения между последовательностью родопсина WT и последовательностью с P23H. Точечная мутация P23H (C→A) падает на N в NGG из последовательности PAM для Cas9, и, таким образом, gRNA будет одинаково нацеливаться как на последовательности WT, так и на последовательности с P23H. Последовательность CAST несет дополнительное изменение основания, которое делает возможным нацеливание gRNA на мутацию, а не последовательность WT.

Фиг. 61 (имеющая отношение к фиг. 42) содержит 11 панелей А-К, показывающих, что LZK является медиатором гибели клеток в первичных RGC. Фиг. 61А демонстрирует сравнение количественной оценки RGC на основе CellTiter-Glo («Выживаемость (RLU)») и на основе Cellomics («Жизнеспособные RGC») во время посева. Фиг. 61В-С демонстрирует капиллярный иммуноанализ (наверху) и количественное определение (внизу) LZK в RGC после трансфекции siRNA (В) или siPOOL (С). Фиг. 61D демонстрирует сравнение количественной оценки на основе CellTiter-Glo («Выживаемость (RLU)») и на основе Cellomics («Жизнеспособные RGC») RGC, трансфицированных siPOOL, нацеленным на Lzk, ± siPOOL, нацеленный на Dlk, через 48 часов после добавления колхицина. NS, незначительный по критерию Манна-Уитни. Фиг. 61Е демонстрирует жизнеспособные RGC (окрашивание кальцеином AM/исключение окрашивания гомодимером этидия; ± SD), количественно оцененные с помощью автоматической флуоресцентной микроскопии. Фиг. 61F демонстрирует капиллярный иммуноанализ (наверху) и количественную оценку (внизу) LZK в RGC через один день после трансфекции с использованием контрольного siPOOL или siPOOL, нацеленного на Lzk, и трансдукции аденовирусом, экспрессирующим устойчивую к siRNA мыши кДНК для LZK человека или GFP в качестве

контроля. Фиг. 61G демонстрирует выживаемость ( $\pm$ SD) RGC WT, трансфицированных siPOOL, нацеленным на Dlk/Lzk, через два дня после восстановления передачи сигналов от LZK с помощью аденовируса, экспрессирующего устойчивую к siRNA мыши кДНК для LZK человека или GFP в качестве контроля («Анализ восстановления LZK»). На фиг. 61H-I представлены типичные микрофотоснимки (H) и количественная оценка (I) длины аксонов (в среднем на нейрон) в RGC, трансфицированных siPOOL и окрашенных кальцеином-AM через три дня после повреждения при иммунопэннинге. Фиг. 61J демонстрирует выживаемость ( $\pm$ SD) RGC WT, трансдуцированных аденовирусом, через два дня после обработки колхицином. На фиг. 61K представлен анализ коиммунопреципитации RGC WT через один день после повреждения при иммунопэннинге.

Фиг. 62 (имеющая отношение к фиг. 43) содержит 6 панелей A-F, показывающих разработку анализа на основе проточной цитометрии (FC) для количественной оценки выживаемости RGC. Фиг. 62A демонстрирует иммунофлуоресцентное окрашивание репрезентативного плоского среза сетчатки глаза у C57BL/6 дикого типа без повреждения. На фиг. 62B представлен двумерный график подвергнутых иммунопэннингу RGC мыши P0-3, проанализированных с помощью FC сразу после иммунопэннинга. На фиг. 62C-D представлены репрезентативные двумерные графики неповрежденных сетчаток (C) или сетчаток через две недели после ONC (раздавливания зрительного нерва) (D), проанализированные с помощью FC. Окна в (C) использовались, чтобы показать процент TUBB3/SNCG дважды позитивных клеток, которые являются дважды позитивными по Thy1.2/NeuN, или наоборот, для сравнения специфичности и чувствительности, соответственно, метода. Средние значения приведены ниже. На фиг. 62E представлена количественная оценка выживших RGC ( $\pm$ SD) на основе FC в различные моменты времени после ONC или имитации (n в скобках). На фиг. 62F представлено сравнение количественной оценки выживших RGC ( $\pm$ SD) на основе FC с ручным подсчетом иммуноокрашенных плоских срезов. В обоих случаях RGC идентифицируются по SNCG/TUBB3 двойному окрашиванию. NS, незначительный по U-критерию Манна-

Уитни.

Фиг. 63 (имеющая отношение к фиг. 44) содержит четыре панели A-D. Результаты скрининга siRNA, нацеленных на весь геном. Фиг. 63A-B показывают порядок ранжирования лучших 48 генов, упорядоченных по Z-показателю после корректировки на вклад, вносимый затравочной последовательностью (A), или лучших 14 генов, определенных с помощью анализа Хейстека. Подтвержденные гены показаны красным. На фиг. 63C-D представлены результаты вторичного скрининга, в котором RGC были трансфицированы четырьмя независимыми siRNA, нацеленными на лучшие гены, определенные с помощью скорректированного на затравочную последовательность анализа (C) или анализа Хейстека (D). Пунктирная линия показывает порог выживаемости, превышающий 3SD от отрицательного контроля.

Фиг. 64 (имеющая отношение к фиг. 45) содержит пять панелей A-E, демонстрирующих нокдаун Mef2a, Puma и Atf2. Фиг. 64A-B демонстрируют капиллярный иммуноанализ вместе с количественной оценкой (наверху, в центре) или кПЦР (внизу), которые выполнены на RGC, трансфицированных отдельными siRNA (A) или siPOOL (B). Фиг. 64C демонстрирует капиллярный иммуноанализ ATF2 из Atf2fl/fl RGC, трансдуцированных аденовирусом, в течение трех дней. Фиг. 64D демонстрирует выживаемость ( $\pm$ SD) RGC, трансдуцированных аденовирусом, через два дня после обработки колхицином. Фиг. 64E демонстрирует количественную оценку на основе FC выживших RGC, с приведением к контролю без повреждения ( $\pm$ SD), через две недели после ONC (раздавливания зрительного нерва) или имитационной операции. Во все глаза инъецировали  $10^9$  вирусных геномов AAV2-Cre за две недели до хирургического вмешательства. \* $P < 0,05$ , U-критерий Манна-Уитни.

Фиг. 65 (имеющая отношение к фиг. 45) содержит две панели, A и B, на которых показано, что повреждение зрительного нерва приводит к DLK-зависимому фосфорилированию MEK2A. На фиг. 65A представлено слитое иммунофлуоресцентное окрашивание репрезентативных срезов сетчатки через два дня после ONC (раздавливания зрительного нерва) или имитационной операции. На

фиг. 65В представлен двумерный график репрезентативных WT или *Dlk1<sup>fl/fl</sup>* сетчаток, проанализированных с помощью FC (проточной цитометрии) через два дня после ONC или имитационной операции.

Фиг. 66 (имеющая отношение к фиг. 46), содержит пять панелей А-Е, на которых представлены результаты скрининга siRNA, нацеленных на весь геном, с повышенной чувствительностью. Фиг. 66А показывает порядок ранжирования 48 лучших генов-кандидатов, упорядоченных по Z-показателю, после корректировки на вклад, вносимый затравочной последовательностью. Ранее подтвержденные гены показаны красным цветом. На фиг. 66В представлен график рассеяния, показывающий активность с поправкой на затравочную последовательность для каждого минипула в библиотеке всего генома. Ранее подтвержденные гены показаны красным цветом. На фиг. 66С представлены результаты вторичного скрининга, в котором RGC были трансфицированы четырьмя независимыми siRNA, нацеленными на лучшие гены, определенные с помощью скорректированного на затравочную последовательность анализа. Пунктирная линия показывает порог выживаемости, превышающий 3SD от отрицательного контроля. Фиг. 66D демонстрирует порядок ранжирования лучших генов, определенных с помощью анализом Хейстека. На фиг. 66Е представлены результаты вторичного скрининга, в котором RGC были трансфицированы четырьмя независимыми siRNA, нацеленными на лучшие гены, определенные с помощью анализа Хейстека. Пунктирная линия показывает порог выживаемости, превышающий 3SD от отрицательного контроля.

Фиг. 67 показывает эффект факторов транскрипции на рост аксонов. Количественная оценка длины аксонов (в среднем на нейрон;  $\pm$ SD) в RGC, трансфицированных siPOOL и окрашенных кальцеином-AM, через три дня после повреждения при иммунопэннинге. \* $P < 0,05$  по критерию Манна-Уитни.

Фиг. 68 (имеющая отношение к фиг. 47) содержит четыре панели А-D, демонстрирующие нокаут с помощью CRISPR *Dlk* в первичных RGC. На фиг. 68А показано расщепление *Bgl*II продуктов ПЦР, амплифицированных с геномной ДНК RGC, экспрессирующих *SpCas9*, через три дня после трансфекции с использованием

tracrRNA или gRNA #4, нацеленной на Dlk, и сохранения в присутствии ингибитора DLK/LZK во избежание селекции. Районы для ПЦР включали сайт-мишень для gRNA #4, нацеленной на Dlk, или 14 лучших сайтов вне мишени, прогнозируемых <http://crispr.mit.edu> (все из которых поддерживают сайт для BglII). На фиг. 68B представлены результаты секвенирования продукта ПЦР Dlk # 4 после субклонирования. Фиг. 68C демонстрирует выживаемость RGC WT в сравнение с SpCas9-экспрессирующими RGC ( $\pm$ SD), трансфицированными tracrRNA или sgRNA, нацеленными на Dlk и Lzk, в отсутствие или в присутствии нейротрофинов (NT, 50 нг/мл BDNF, 5 нг/мл GDNF, 5 нг/мл CNTF) через два дня после обработки колхицином. \* $P < 0,05$  по критерию Манна-Уитни. Фиг. 68D демонстрирует разницу в выживаемости (SpCas9-WT;  $\pm$ SD), обусловленную трансфекцией второй совокупности sgRNA, направленных на каждый из четырех факторов транскрипции, по отдельности или в комбинации, и по сравнению с tracrRNA в качестве отрицательного контроля.

Фиг. 69 показывает, что фармакологическое ингибирование DLK и LZK, в том числе сунитинибом, одобренных FDA ингибитором в виде небольшой молекулы, способствует выживаемости RGC, происходящих из ESC человека. На фиг. 69A представлена выживаемость ( $\pm$ SD) RGC, происходящих от hESC, через два дня после обработки носителем или колхицином (1 мкл) в присутствии ингибиторов DLK/LZK тозасертиба (1 мкл), ингибитора 123 Genentech (0,1 мкМ) или носителя в качестве контроля. На фиг. 69B представлена выживаемость ( $\pm$ SD) RGC, происходящий от hESC, через два дня после обработки колхицином (1 мкМ) в присутствии возрастающих доз сунитиниба.

На фиг. 70 представлено редактирование генома *in vivo* с использованием одного варианта конструкции, нацеленной на родопсин.

На фиг. 71 представлено редактирование генома *in vivo* с использованием одного варианта конструкции, нацеленной на родопсин. Клетки из общей сетчатки были использованы для анализа расщепления (с использованием неочищенных фоторецепторов), и

небольшие уровни расщепления обнаруживаются через 14 дней, которые увеличиваются через 28 дней.

На фиг. 72 представлены слитые конструкции, в которых используется вариант Cas9, не способный расщеплять ДНК-мишень, для модуляции регуляции транскрипции. Эти конструкции могут быть доставлены с помощью AAV с использованием двунаправленного промотора H1.

На фиг. 73 представлена схема промотора родопсина и сайты связывания белка в области промотора. Нарушая эти взаимодействия, можно подавить транскрипцию этого аллеля в цис-положении, а, используя SNP в области промотора, можно доставлять нерасщепляющие варианты Cas9 для лечения ADRP.

На фиг. 74 представлена схема промотора родопсина и области RER (наверху). Средняя панель показывает продукты ПЦР из трех различных мышечных клеток/линий, которые были секвенированы по Сэнгеру. Указаны идентифицированные SNPs, но расположения SNPs указаны на нижней схеме. Было идентифицировано несколько областей, которые позволяют использовать эти вариации последовательности для модуляции экспрессии родопсина в цис-положении.

На фиг. 75 показано сканирование области размером ~2 т.о. в области промотора родопсина (от RER до начала транскрипции) на предмет сайтов нацеливания CRISPR. 6 сайтов вблизи RER и 6 сайтов вблизи проксимального района промотора были выбраны и проанализированы на расщепление (эффективность расщепления была использована в качестве механизма для идентификации доступных областей, обеспечивающих высокую эффективность связывания). Было идентифицировано несколько последовательностей-кандидатов, которые могли бы сделать возможной модуляцию с помощью dCas9 либо путем простого нарушения образования петель хроматина между RER/проксимальным районом промотора, либо с помощью слияния (активаторного/репрессорного домена) с dCas9.

На фиг. 76 представлена мышь, экспрессирующая Rho-GFP, для проверки способов расщепления и нерасщепления на неполных последовательностях человека. Ниже анализ *in vivo* с

использованием очищенных фоторецепторов от трансгенной по Rho-GFP мыши и поиск потери GFP при нацеливании CRISPR.

На фиг. 77 представлен анализ по гену-репортеру для исследования конструкций не расщепляющего Cas9, слитых либо с активаторным, либо репрессорным доменом.

#### **ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ**

Раскрываемый сейчас предмет изобретения теперь будет описан более полно со ссылкой на сопроводительные фигуры, на которых продемонстрированы некоторые, но не все варианты осуществления раскрываемого сейчас предмета изобретения. Одинаковые числа относятся к одинаковым элементам повсюду. Раскрываемый сейчас предмет изобретения может быть воплощен во многих различных формах и не должен рассматриваться как ограниченный вариантами осуществления, представленными здесь; скорее, эти варианты осуществления предоставлены, чтобы это раскрытие соответствовало применимым юридическим требованиям. Действительно, многие модификации и другие варианты осуществления раскрываемого сейчас предмета изобретения, изложенного здесь, будут приходить на ум специалисту в данной области техники, к которой относится раскрываемый сейчас предмет изобретения, используя преимущества учений, представленных в предшествующих описаниях и связанных фигурах. Поэтому следует понимать, что раскрываемый сейчас предмет изобретения не должен ограничиваться конкретными раскрытыми вариантами осуществления, и что модификации и другие варианты осуществления, как предполагается, включены в объем прилагаемой формулы изобретения.

Технологии редактирования генома, такие как нуклеазы с цинковыми пальцами (ZFN) (Porteus, and Baltimore (2003) *Science* 300: 763; Miller et al. (2007) *Nat. Biotechnol.* 25:778-785; Sander et al. (2011) *Nature Methods* 8:67-69; Wood et al. (2011) *Science* 333:307) и нуклеазы-эффекторы, подобные активаторам транскрипции, (TALEN) (Wood et al. (2011) *Science* 333:307; Boch et al. (2009) *Science* 326:1509-1512; Moscou and Bogdanove (2009) *Science* 326:1501; Christian et al. (2010) *Genetics* 186:757-761; Miller et al. (2011) *Nat. Biotechnol.* 29:143-148; Zhang et al. (2011) *Nat. Biotechnol.* 29:149-153; Reyon et al. (2012) *Nat.*

*Biotechnol.* 30:460-465) наделены способностью создавать целенаправленные модификации генома и дают возможность точно корректировать мутации, вызывающие заболевания. Несмотря на свою эффективность, эти технологии обременены ограничениями практического характера, поскольку пары ZFN и TALEN нуждаются в синтезе больших и уникальных белков, осуществляющих распознавание конкретного сайта-мишени в ДНК. Несколько групп недавно сообщили о высокоэффективном редактировании генома с помощью специально разработанной системы CRISPR/Cas9 типа II, которая обходит эти ключевые ограничения (Cong et al. (2013) *Science* 339:819-823; Jinek et al. (2013) *eLife* 2:e00471; Mali et al. (2013) *Science* 339:823-826; Cho et al. (2013) *Nat. Biotechnol.* 31:230-232; Hwang et al. (2013) *Nat. Biotechnol.* 31:227-229). В отличие от ZFN и TALEN, получение которых является относительно трудоемким и трудным, синтез конструкций CRISPR, которые основаны на нуклеазной активности белка Cas9 в сочетании с синтетической РНК-проводником (gRNA), является простым и быстрым, и эти конструкции могут быть мультиплексированы. Однако, несмотря на относительную легкость их синтеза, CRISPR имеют технологические ограничения, связанные с их доступом к таргетируемому месту в геноме, который зависит как от свойств самого Cas9, так и от синтеза его gRNA.

Для расщепления с помощью системы CRISPR требуется комплементарное спаривания оснований gRNA с 20-нуклеотидной ДНК-последовательностью и необходимым мотивом, прилегающим к протоспейсеру, (PAM), коротким нуклеотидным мотивом, находящимся 3' от сайта-мишени (Jinek et al. (2012) *Science* 337: 816-821). Теоретически мишенью может стать любая уникальная последовательность N<sub>20</sub>-PAM в геноме при использовании технологии CRISPR. ДНК-связывающая специфичность последовательности PAM, которая варьирует в зависимости от вида, от которого происходит используемый специфический Cas9, накладывает одно ограничение. В настоящее время наименее ограничивающий и наиболее часто используемый белок Cas9, который распознает последовательность NGG, происходит от *S. pyogenes*, и, таким образом, любая уникальная 21-нуклеотидная последовательность в геноме, за

которой следуют два гуаниновых нуклеотида ( $N_{20}NGG$ ), может стать мишенью. Расширение доступного для нацеливания места, предписываемого белковым компонентом, ограничено открытием и использованием новых белков Cas9 с измененными требованиями к PAM (Cong et al. (2013) *Science* 339: 819-823; Hou et al. (2013) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 110(39):15644-9), или находится в ожидании создания новых вариантов Cas9 посредством мутагенеза или направленной эволюции. Второе технологическое ограничение системы CRISPR возникает из-за экспрессии gRNA, инициируемой в 5'-гуаниновом нуклеотиде. Использование промотора для РНК-полимеразы класса III было особенно подходящим для экспрессии gRNA, поскольку эти короткие некодирующие транскрипты имеют четко определенные концы, и все необходимые для транскрипции элементы, за исключением 1+ нуклеотида, содержатся в 5' (вышерасположенной) области промотора. Однако, поскольку для обычно используемого промотора U6 требуется гуаниновый нуклеотид для инициации транскрипции, использование промотора U6 дополнительно ограничивало геномные сайты для нацеливания сайтами  $GN_{19}NGG$  (Mali et al. (2013) *Science* 339:823-826; Ding et al. (2013) *Cell Stem Cell* 12:393-394). Альтернативные подходы, такие как транскрипция *in vitro* с помощью промоторов T7, T3 или SP6, также потребовали бы инициации в гуаниновом нуклеотиде(ах) (Adhya et al. (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78:147-151; Melton et al. (1984) *Nucleic Acids Res.* 12:7035-7056; Pleiss et al. (1998) *RNA* 4:1313-1317).

Раскрываемый сейчас предмет изобретения относится к модификации системы CRISPR/Cas9 для воздействия на дегенерации сетчатки, в которой используется промотор H1 для экспрессии РНК-проводников (gRNA или sgRNA) (WO2015/19561, которая полностью включена сюда посредством ссылки), которые нацелены на связанные с дегенерацией сетчатки гены, такие как, но без ограничения ими, вызывающий LCA10 ген CEP290, родопсин, киназа с двойной лейциновой застежкой-молнией (DLK), киназа с лейциновой застежкой-молнией (LZK), JNK1-3, MKK4, MKK7, ATF2, JUN, MEF2A, SOX11 или PUMA. Такая модифицированная система CRISPR/Cas9 может

быть нацелена точно на патогенные мутации при этих дегенерациях сетчатки с большей эффективностью, безопасностью и точностью. Кроме того, включающие эту модификацию gRNA сохраняют компактную природу H1-промоторной системы CRISPR/Cas9, которая позволяет воздействовать на дегенерации сетчатки с большей дискретностью по сравнению с существующими технологиями CRISPR, TALEN или «цинковый палец».

I. ЭКСПРЕССИЯ РНК-ПРОВОДНИКОВ ДЛЯ CRISPR, МИШЕНЬМИ КОТОРЫХ ЯВЛЯЮТСЯ ДЕГЕНЕРАЦИИ СЕТЧАТКИ, С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПРОМОТОРА H1

*A. Композиции*

В некоторых вариантах осуществления в раскрываемых сейчас способах лечения дегенераций сетчатки используется композиция, содержащая модификацию не встречающейся в природе системы CRISPR, ранее описанной в WO 2015/195621 (которая полностью включена сюда посредством ссылки). В случае такой модификации используются определенные gRNA, которые нацелены на связанные с дегенерацией сетчатки гены, такие как, но без ограничения ими, вызывающий LCA10 ген CEP290, родопсин, киназа с двойной лейциновой застежкой-молнией (DLK), киназа с лейциновой застежкой-молнией (LZK), JNK1-3, MKK4, MKK7, ATF2, JUN, MEF2A, SOX11 или PUMA. В некоторых вариантах осуществления композиция содержит (a) не встречающуюся в природе нуклеазную систему (например, CRISPR), включающую один или более векторов, включающих: i) промотор (например, двунаправленный промотор H1), функционально связанный с по меньшей мере одной нуклеотидной последовательностью, кодирующей РНК-проводник (gRNA) нуклеазной системы, причем gRNA гибридизуется с последовательностью-мишенью молекулы ДНК в клетке субъекта, и причем молекула ДНК кодирует один или более продуктов генов, экспрессируемых в клетке; и ii) действующий в клетке регуляторный элемент, функционально связанный с нуклеотидной последовательностью, кодирующей нацеленную на геном нуклеазу (например, белок Cas9), причем компоненты (i) и (ii) расположены в одном и том же или разных векторах системы, причем gRNA нацеливается и гибридизуется с последовательностью-мишенью, а нуклеаза расщепляет молекулу ДНК с изменением экспрессии одного или более продуктов генов. В

некоторых вариантах осуществления система упакована в одну частицу аденоассоциированного вируса (AAV). В некоторых вариантах осуществления аденоассоциированный вирус (AAV) может включать любой из 51 серотипа аденовируса человека (например, серотипы 2, 5 или 35). В некоторых вариантах осуществления система инактивирует один или более продуктов генов. В некоторых вариантах нуклеазная система вырезает по меньшей мере одну мутацию в гене. В некоторых вариантах осуществления промотор включает: а) контрольные элементы, которые обеспечивают транскрипцию в одном направлении по меньшей мере одной нуклеотидной последовательности, кодирующей gRNA; и б) контрольные элементы, которые обеспечивают транскрипцию в противоположном направлении нуклеотидной последовательности, кодирующей нацеленную на ген нуклеазу. В некоторых вариантах осуществления белок Cas9 является оптимизированным в отношении частоты использования кодонов для экспрессии в клетке. В некоторых вариантах осуществления промотор функционально связан с по меньшей мере одной, двумя, тремя, четырьмя, пятью, шестью, семью, восемью, девятью или десятью gRNA. В некоторых вариантах осуществления последовательность-мишень представляет собой мутацию в гене CEP290 (например, вызывающем LCA10 гене CEP290). В некоторых вариантах осуществления последовательность-мишень для CEP290 выбирают из группы, состоящей из нуклеотидных последовательностей, представленных в SEQ ID NO:1-109, 164-356, 735-738, или их комбинаций. В некоторых вариантах осуществления последовательность-мишень включает SEQ ID NO:1, 2, 3 и 4, функционально связанные. В некоторых вариантах осуществления вектор включает нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO:110. В некоторых вариантах осуществления один или более продуктов генов представляют собой родопсин. В некоторых вариантах осуществления последовательность-мишень представляет собой мутацию в гене родопсина. В некоторых вариантах осуществления последовательность-мишень представляет собой мутацию в R135 гена родопсина (например, R135G, R135W, R135L). В некоторых вариантах осуществления последовательность-мишень для R135 родопсина выбирают из группы, состоящей из нуклеотидных

последовательностей, представленных в SEQ ID NO:111-126, или их комбинаций. В некоторых вариантах осуществления последовательность gRNA для R135 родопсина выбирают из группы, состоящей из нуклеотидных последовательностей, представленных в SEQ ID NO:127-142, или их комбинаций. В некоторых вариантах осуществления один или более продуктов генов представляют собой киназу с двойной лейциновой застежкой-молнией (DLK), киназу с лейциновой застежкой-молнией (LZK), JNK1-3, MKK4, MKK7, ATF2, JUN, MEF2A, SOX11 или PUMA, или их комбинации. В некоторых вариантах осуществления мишени-мутации в случае глаукомы включают, но без ограничения ими, OPTN, TBK1, TMC01, PMM2, GMDS, GAS7, FNDC3B, TXNRD2, ATXN2, CAV1/CAV2, p16INK4a, SIX6, ABCA1, AFAP1 и CDKN2B-AS. В некоторых вариантах осуществления последовательность-мишень в случае глаукомы выбирают из группы, состоящей из нуклеотидных последовательностей, представленных в SEQ ID NO:143-163, или их комбинаций.

В некоторых вариантах осуществления в раскрываемых сейчас способах лечения дегенераций сетчатки используется композиция, содержащая не встречающуюся в природе систему CRISPR, включающую один или более векторов, включающих: а) промотор H1, функционально связанный с по меньшей мере одной нуклеотидной последовательностью, кодирующей РНК-проводник (gRNA) системы CRISPR, причем gRNA гибридизуется с последовательность-мишенью молекулы ДНК в клетке, и причем молекула ДНК кодирует один или более продуктов генов, экспрессируемых в клетке; и б) действующий в клетке регуляторный элемент, функционально связанный с нуклеотидной последовательностью, кодирующей белок Cas9, причем компоненты (а) и (б) расположены в одном и том же или в разных векторах системы, причем gRNA нацеливается и гибридизуется с последовательность-мишень, а белок Cas9 расщепляют молекулу ДНК с изменением экспрессии одного или более продуктов генов.

В некоторых вариантах осуществления в раскрываемых сейчас способах лечения дегенераций сетчатки используется композиция, содержащая не встречающуюся в природе систему CRISPR, включающую один или более векторов, включающих: а) промотор H1,

функционально связанный с по меньшей мере одной нуклеотидной последовательностью, кодирующей РНК-проводник (gRNA) системы CRISPR, причем gRNA гибридизуется с последовательностью-мишенью молекулы ДНК в эукариотической клетке, и причем молекула ДНК кодирует один или более продуктов генов, экспрессируемых в эукариотической клетке; и b) действующий в эукариотической клетке регуляторный элемент, функционально связанный с нуклеотидной последовательностью, кодирующей белок Cas9 типа II, причем компоненты (a) и (b) расположены в одном и том же или в разных векторах системы, в результате чего gRNA нацеливается и гибридизуется с последовательностью-мишенью, а белок Cas9 расщепляет молекулу ДНК, в результате чего изменяется экспрессия одного или более продуктов генов. В одном аспекте последовательность-мишень может представлять собой последовательность-мишень, которая начинается с любого нуклеотида, например, N<sub>20</sub>NGG. В некоторых вариантах осуществления последовательность-мишень включает нуклеотидную последовательность AN<sub>19</sub>NGG. В некоторых вариантах осуществления последовательность-мишень включает нуклеотидную последовательность GN<sub>19</sub>NGG. В некоторых вариантах осуществления последовательность-мишень включает нуклеотидную последовательность CN<sub>19</sub>NGG. В некоторых вариантах осуществления последовательность-мишень включает нуклеотидную последовательность TN<sub>19</sub>NGG. В некоторых вариантах осуществления последовательность-мишень включает нуклеотидную последовательность AN<sub>19</sub>NGG или GN<sub>19</sub>NGG. В другом аспекте белок Cas9 является оптимизированным в отношении частоты использования кодонов для экспрессии в клетке. В другом аспекте белок Cas9 является оптимизированным в отношении частоты использования кодонов для экспрессии в эукариотической клетке. В дополнительном аспекте эукариотическая клетка представляет собой клетку млекопитающего или человека. В еще одном аспекте экспрессия одного или более продуктов генов снижается.

В некоторых вариантах осуществления в раскрываемых сейчас способах лечения дегенераций сетчатки используется композиция, содержащая не встречающуюся в природе систему CRISPR, включающую

вектор, включающий двунаправленный промотор H1, причем двунаправленный промотор H1 включает: а) контрольные элементы, которые обеспечивают транскрипцию в одном направлении по меньшей мере одной нуклеотидной последовательности, кодирующей РНК-проводник (gRNA) системы CRISPR, причем gRNA гибридизуется с последовательностью-мишенью молекулы ДНК в эукариотической клетке, и причем молекула ДНК кодирует один или более продуктов генов, экспрессируемых в эукариотической клетке; и б) контрольные элементы, которые обеспечивают транскрипцию в противоположном направлении нуклеотидной последовательности, кодирующей белок Cas9 типа II, в результате чего gRNA нацеливается и гибридизуется с последовательностью-мишенью, а белок Cas9 расщепляет молекулу ДНК, в результате чего экспрессия одного или более продуктов генов изменяется. В одном аспекте последовательность-мишень может представлять собой последовательность-мишень, которая начинается с любого нуклеотида, например, N<sub>20</sub>NGG. В некоторых вариантах осуществления последовательность-мишень включает нуклеотидную последовательность AN<sub>19</sub>NGG. В некоторых вариантах осуществления последовательность-мишень включает нуклеотидную последовательность GN<sub>19</sub>NGG. В некоторых вариантах осуществления последовательность-мишень включает нуклеотидную последовательность CN<sub>19</sub>NGG. В некоторых вариантах осуществления последовательность-мишень включает нуклеотидную последовательность TN<sub>19</sub>NGG. В некоторых вариантах осуществления последовательность-мишень включает нуклеотидную последовательность AN<sub>19</sub>NGG или GN<sub>19</sub>NGG. В другом аспекте белок Cas9 является оптимизированным в отношении частоты использования кодонов для экспрессии в клетке. В другом аспекте белок Cas9 является оптимизированным в отношении частоты использования кодонов для экспрессии в эукариотической клетке. В дополнительном аспекте эукариотическая клетка представляет собой клетку млекопитающего или человека. В еще одном аспекте экспрессия одного или более продуктов генов снижается.

В некоторых вариантах осуществления комплекс CRISPR включает одну или более последовательностей ядерной локализации

достаточной силы, чтобы управлять накоплением комплекса CRISPR в детектируемом количестве в ядре клетки (например, эукариотической клетки). Не желая быть ограниченными какой-либо теорией, полагают, что последовательность ядерной локализации не является необходимой для активности комплекса CRISPR у эукариот, но что включение таких последовательностей усиливает активность системы, особенно в отношении нацеливания на молекулы нуклеиновой кислоты в ядре. В некоторых вариантах осуществления фермент CRISPR представляет собой фермент системы CRISPR типа II. В некоторых вариантах осуществления фермент CRISPR представляет собой фермент Cas9. В некоторых вариантах осуществления фермент Cas9 представляет собой Cas9 *S. pneumoniae*, *S. pyogenes* или *S. thermophilus* и может включать мутированный Cas9, происходящий от этих организмов. Фермент может представлять собой гомолог или ортолог Cas9.

В общем, и на протяжении всего этого описания термин «вектор» относится к молекуле нуклеиновой кислоты, способной транспортировать другую нуклеиновую кислоту, с которой она связана. Векторы включают, но без ограничения ими, молекулы нуклеиновой кислоты, которые являются одноцепочечными, двухцепочечными или частично двухцепочечными; молекулы нуклеиновой кислоты, которые содержат один или более свободных концов, не содержат свободных концов (например, являются кольцевыми), молекулы нуклеиновой кислоты, которые включают ДНК, РНК или то и другое; и другие разновидности полинуклеотидов, известные в данной области техники. Одним типом вектора является «плазмида», которая относится к кольцевой петле двухцепочечной ДНК, в которую могут быть встроены дополнительные сегменты ДНК, например, с помощью стандартных методов молекулярного клонирования. Другим типом вектора является вирусный вектор, причем вирусные последовательности ДНК или РНК присутствуют в векторе для упаковки в вирус (например, ретровирусы, дефектные по репликации ретровирусы, аденовирусы, дефектные по репликации аденовирусы и аденоассоциированные вирусы). Вирусные векторы также включают полинуклеотиды, переносимые вирусом для трансфекции в клетку-хозяина.

Некоторые векторы (например, бактериальные векторы, имеющие бактериальное начало репликации, и эписомальные векторы млекопитающих) способны к автономной репликации в клетке-хозяине, в которую они введены. Другие векторы (например, неэписомальные векторы млекопитающих) интегрируются в геном клетки-хозяина при введении в клетку-хозяина и, таким образом, реплицируются вместе с геномом хозяином. Более того, некоторые векторы способны управлять экспрессией генов, с которыми они функционально связаны. Такие векторы называются здесь «экспрессионными векторами». Общие экспрессионные векторы, используемые в методах рекомбинантных ДНК, часто находятся в форме плазмид.

Рекомбинантные экспрессионные векторы могут включать нуклеиновую кислоту раскрываемого здесь предмета изобретения в форме, подходящей для экспрессии нуклеиновой кислоты в клетке-хозяине, что означает, что рекомбинантные экспрессионные векторы включают один или более регуляторных элементов, который может быть выбран на основе клеток-хозяев, которые будут использоваться для экспрессии, который функционально связан с последовательностью нуклеиновой кислоты, которая должна быть экспрессирована.

В рамках рекомбинантного экспрессионного вектора, «функционально связанный» означает, что представляющая интерес нуклеотидная последовательность связана с регуляторным элементом(ами) таким образом, который делает возможной экспрессию нуклеотидной последовательности (например, в системе транскрипции/трансляции *in vitro* или в клетке-хозяине, когда вектор вводится в клетку-хозяина).

Предполагается, что термин «регуляторный элемент» включает промоторы, энхансеры, внутренние сайты посадки рибосом (IRES) и другие контролирующие экспрессию элементы (например, сигналы терминации транскрипции, такие как сигналы полиаденилирования и последовательности поли-U). Такие регуляторные элементы описаны, например, в Goeddel (1990) *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology* 185, Academic Press, San Diego, CA. Регуляторные элементы включают элементы, которые осуществляют управление

конститутивной экспрессией нуклеотидной последовательности во многих типах клеток-хозяев, и те, которые управляют экспрессией нуклеотидной последовательности только в определенных клетках-хозяевах (например, тканеспецифические регуляторные последовательности). Тканеспецифический промотор может управлять экспрессией в основном в желаемой ткани, представляющей интерес, такой как мышца, нейрон, кость, кожа, кровь, конкретные органы (например, печень, поджелудочная железа), или клетках определенных типов (например, ах). Регуляторные элементы могут также управлять экспрессией в зависимости от времени, например, в зависимости от клеточного цикла или стадии развития, которая может быть или не быть также специфичной для ткани или типа клеток.

В некоторых вариантах осуществления вектор включает один или более промоторов *pol* III (для полимеразы III, один или более промоторов *pol* II, один или более промоторов *pol* I или их комбинации. Примеры промоторов *pol* III включают, но без ограничения ими, промоторы U6 и H1. Примеры промоторов *pol* II включают, но без ограничения ими, промотор LTR ретровируса саркомы Рауса (RSV) (необязательно с энхансером RSV), промотор цитомегаловируса (CMV) (необязательно с энхансером CMV) (например, Boshart et al. (1985) *Cell* 41: 521-530), промотор SV40, промотор гена дигидрофолатредуктазы, промотор гена  $\beta$ -актина, промотор гена фосфоглицеринкиназы (PGK) и промотор EF1 $\alpha$ .

Термин «регуляторный элемент» также включает энхансерные элементы, такие как WPRE; энхансеры CMV; сегмент R-U5' в LTR HTLV-I (Takebe et al. (1988) *Mol Cell. Biol.* 8: 466-472); энхансер SV40; и последовательность интрона между экзонами 2 и 3 кроличьего  $\beta$ -глобина (O'Hare et al. (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 78(3):1527-31). Специалистам в данной области техники будет понятно, что конструкция экспрессионного вектора может зависеть от таких факторов, как выбор клетки-хозяина, подлежащей трансформации, желаемый уровень экспрессии и т.д. Вектор может быть введен в клетки-хозяева для продукции тем самым транскриптов, белков или пептидов, включая слитые белки или

пептиды, кодируемые нуклеиновыми кислотами, описываемыми здесь (например, транскриптов с коротких палиндромных повторов, регулярно расположенных группами, (CRISPR), белков, ферментов, их мутантных форм, их слитых белков и т.д.). Предпочтительные векторы включают лентивирусы и аденоассоциированные вирусы, и типы таких векторов также могут быть выбраны для нацеливания на конкретные типы клеток.

Термины «полинуклеотид», «нуклеотид», «нуклеотидная последовательность», «нуклеиновая кислота» и «олигонуклеотид» используются взаимозаменяемо. Они относятся к полимерной форме нуклеотидов любой длины, либо дезоксирибонуклеотидов, либо рибонуклеотидов, либо их аналогов. Полинуклеотиды могут иметь любую трехмерную структуру и могут выполнять любую функцию, известную или неизвестную. Ниже приведены неограничивающие примеры полинуклеотидов: кодирующие или не кодирующие области гена или фрагмента гена, локусы (локус), определенные из анализа групп сцепления между ними, экзоны, интроны, информационная РНК (мРНК), транспортная РНК, рибосомная РНК, короткая интерферирующая РНК (siRNA), РНК с короткой шпилькой (shRNA), микро-РНК (miRNA), рибозимы, кДНК, рекомбинантные полинуклеотиды, разветвленные полинуклеотиды, плазмиды, векторы, выделенная ДНК любой последовательности, выделенная РНК любой последовательности, НК-зонды и праймеры. Полинуклеотид может включать один или более модифицированных нуклеотидов, таких как метилированные нуклеотиды и аналоги нуклеотидов. Если они присутствуют, модификации нуклеотидной структуры могут быть переданы до или после сборки полимера. Последовательность нуклеотидов может быть прервана ненуклеотидными компонентами. Полинуклеотид может быть дополнительно модифицирован после полимеризации, например, путем конъюгирования с метящим компонентом.

В некоторых аспектах раскрываемого сейчас предмета изобретения термины «химерная РНК», «химерная РНК-проводник», «РНК-проводник», «одиночная РНК-проводник» и «синтетическая РНК-проводник» используются взаимозаменяемо и относятся к полинуклеотидной последовательности, включающей

последовательность-проводник. Термин «последовательность-проводник» относится к последовательности длиной приблизительно 20 п.о. в РНК-проводнике, которая определяет сайт-мишень, и может использоваться взаимозаменяемо с терминами «проводник» или «спейсер».

Используемый здесь термин «дикий тип» является термином в данной области техники, понятным специалистам, и означает типичную форму организма, штамма, гена или характеристики, как она встречается в природе, в отличие от мутантных или вариантных форм.

Используемый здесь термин «вариант» следует понимать как проявление качеств, которые имеют характер, который отличается от того, который встречается в природе.

Термины «не встречающийся в природе» или «сконструированный» используются взаимозаменяемо и указывают на задействованность руки человека. Термины, относящиеся к молекулам нуклеиновой кислоты или полипептидам, означают, что молекула нуклеиновой кислоты или полипептид, по меньшей мере, в основном не содержит по меньшей мере один другой компонент, с которым они естественно связаны в природе и обнаруживаются в природе.

«Комплементарность» относится к способности нуклеиновой кислоты к образованию водородной связи (ей) с другой последовательностью нуклеиновой кислоты либо путем традиционного спаривания основания по Уотсону-Крику, либо с помощью других нетрадиционных типов. Процент комплементарности означает процент остатков в молекуле нуклеиновой кислоты, которые могут образовывать водородные связи (например, при спаривании оснований по Уотсону-Крику) со второй последовательностью нуклеиновой кислоты (например, 5, 6, 7, 8, 9, 10 из 10 комплементарны на 50%, 60%, 70%, 80%, 90% и 100%). «Полностью комплементарный» означает, что все следующие друг за другом остатки последовательности нуклеиновой кислоты будут образовывать водородную связь с тем же числом следующих друг за другом остатков во второй последовательности нуклеиновой кислоты. «По существу комплементарный», как здесь используется,

относится к степени комплементарности, которая составляет по меньшей мере 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% или 100% в области из 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 25, 30, 35, 40, 45, 50 или более нуклеотидов, или относится к двум нуклеиновым кислотам, которые гибридизуются в жестких условиях.

Используемый здесь термин «жесткие условия» для гибридизации относится к условиям, при которых нуклеиновая кислота, комплементарная последовательности-мишени, преимущественно гибридизуется с последовательностью-мишенью и по существу не гибридизуется с последовательностями, не являющимися мишенями. Жесткие условия, как правило, зависят от последовательности и варьируют в зависимости от ряда факторов. Как правило, чем длиннее последовательность, тем выше температура, при которой последовательность специфически гибридизуется с последовательностью-мишенью. Неограничивающие примеры жестких условий подробно описаны в Tijssen (1993), *Laboratory Techniques In Biochemistry And Molecular Biology-Hybridization With Nucleic Acid Probes Part 1, Second Chapter "Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid probe assay"*, Elsevier, N.Y.

«Гибридизация» относится к реакции, в которой один или более полинуклеотидов взаимодействуют с образованием комплекса, который стабилизируется через образование водородных связей между основаниями нуклеотидных остатков. Образование водородных связей может происходить посредством спаривания оснований по Уотсону-Крику, связывания по Хогстину или любым другим способом, специфичным для последовательности. Комплекс может включать две цепи, образующие дуплексную структуру, три или более цепей, образующих комплекс с множеством цепей, одну самогибридирующуюся цепь или любую их комбинацию. Реакция гибридизации может представлять собой стадию в более широком процессе, таком как инициация ПЦР или расщепление полинуклеотида ферментом. Последовательность, способная к гибридизации с данной последовательностью, называется «комплементом» данной последовательности.

Используемый здесь термин «экспрессия» относится к процессу, посредством которого полинуклеотид транскрибируется с ДНК-матрицы (например, в мРНК или другой РНК-транскрипт), и/или к процессу, с помощью которого транскрибированная мРНК впоследствии транслируется в пептиды, полипептиды или белки. Транскрипты и кодируемые полипептиды могут в совокупности называться «продукт гена». Если полинуклеотид происходит от геномной ДНК, экспрессия может включать сплайсинг мРНК в эукариотической клетке.

Термины «полипептид», «пептид» и «белок» используются здесь взаимозаменяемо для обозначения полимеров аминокислот любой длины. Полимер может быть линейным или разветвленным, он может включать модифицированные аминокислоты, и он может прерываться не аминокислотами. Термины также охватывают аминокислотный полимер, который был подвергнут модификации; например, образованию дисульфидной связи, гликозилированию, липидизации, фосфорилированию или любой другой манипуляции, такой как конъюгация с метящим компонентом.

Используемый здесь термин «аминокислота» включает природные и/или неприродные или синтетические аминокислоты, включая глицин и D или L оптические изомеры, а также аналоги аминокислот и пептидомиметики.

При осуществлении настоящего раскрываемого сейчас предмета изобретения используются, если не указано иное, традиционные методы иммунологии, биохимии, химии, молекулярной биологии, микробиологии, клеточной биологии, геномики и рекомбинантной ДНК, которые известны специалистам в данной области техники (Sambrook, Fritsch and Maniatis (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd edition; Ausubel et al., eds. (1987) *Current Protocols in Molecular Biology*); MacPherson et al., eds. (1995) *Methods in Enzymology* (Academic Press, Inc.): PCR 2: A Practical Approach); Harlow and Lane, eds. (1988) *Antibodies, A Laboratory Manual*; Freshney, ed. (1987) *Animal Cell Culture*).

Несколько аспектов раскрываемого сейчас предмета изобретения относятся к векторным системам, включающим один или более векторов, или векторам как таковым. Векторы могут быть

сконструированы для экспрессии транскриптов CRISPR (например, транскриптов с нуклеиновых кислот, белков или ферментов) в прокариотических или эукариотических клетках. Например, транскрипты CRISPR могут экспрессироваться в бактериальных клетках, таких как *Escherichia coli*, в клетках насекомых (с использованием бакуловирусных экспрессионных векторов), дрожжевых клетках или клетках млекопитающих. Подходящие клетки-хозяева обсуждаются далее в Goeddel (1990) *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology* 185, Academic Press, San Diego, CA. Альтернативно, рекомбинантный экспрессионный вектор может быть транскрибирован и транслирован *in vitro*, например, с использованием регуляторных последовательностей промотора T7 и полимеразы T7.

Векторы могут быть введены и размножены в прокариоте. В некоторых вариантах осуществления прокариот используется для увеличения количества копий вектора, который должен быть введен в эукариотическую клетку, или в качестве промежуточного вектора при получении вектора, который должен быть введен в эукариотическую клетку (например, амплификации плазмиды в качестве части пакующей системы вирусного вектора). В некоторых вариантах осуществления прокариот используется для увеличения количества копий вектора и экспрессии одной или более нуклеиновых кислот, например, для обеспечения источника одного или более белков для доставки в клетку-хозяина или организм-хозяина. Экспрессия белков в прокариотах чаще всего осуществляется в *Escherichia coli* с использованием векторов, содержащих конститутивные или индуцибельные промоторы, управляющие экспрессией слитых или не слитых белков.

Векторы для экспрессии слияний добавляют ряд аминокислот к белку, закодированному в них, например к N-концу рекомбинантного белка. Такие векторы для экспрессии слияний могут служить одной или несколькими целям, таким как: (i) чтобы увеличить экспрессию рекомбинантного белка; (ii) чтобы повысить растворимость рекомбинантного белка; и (iii) чтобы помочь в очистке рекомбинантного белка, действуя в качестве лиганда при аффинной очистке. Часто в векторах для экспрессии слияний сайт

протеолитического расщепления вводится на стыке рекомбинантного белка и другой части слияния, чтобы сделать возможным отделение рекомбинантного белка от другой части слияния после очистки слитого белка. Такие ферменты и узнаваемые ими последовательности включают фактор Ха, тромбин и энтерокиназу. Примеры векторов для экспрессии слияний включают pGEX (Pharmacia Biotech Inc; Smith and Johnson (1988) *Gene* 67: 31-40), pMAL (New England Biolabs, Beverly, Mass.) и pRIT5 (Pharmacia, Piscataway, N.J.), в которых глутатион-S-трансфераза (GST), белок, связывающий мальтозу E, или белок A, соответственно, сливается с целевым рекомбинантным белком.

Примеры подходящих векторов для индуцибельной экспрессии неслитых белков в *E.coli* включают pTrc (Amrann et al. (1988) *Gene* 69:301-315) и pET 11d (Studier et al. (1990) *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology* 185, Academic Press, San Diego, Calif.).

В некоторых вариантах осуществления вектор представляет собой вектор для экспрессии в дрожжах. Примеры векторов для экспрессии в дрожжах *Saccharomyces cerevisiae* включают pYerSec1 (Baldari, et al.(1987) *EMBO J.* 6: 229-234), pMFa (Kuijan and Herskowitz (1982) *Cell* 30: 933-943), pJRY88 (Schultz et al. (1987) *Gene* 54: 113-123), pYES2 (Invitrogen Corporation, San Diego, Calif.), и picZ (InVitrogen Corp, San Diego, Calif.).

В некоторых вариантах осуществления экспрессией одной или более последовательностей в клетках млекопитающих можно управлять с использованием вектора для экспрессии в клетках млекопитающих. Примеры векторов для экспрессии в клетках млекопитающих включают pCDM8 (Seed (1987) *Nature* 329: 840) и pMT2PC (Kaufman et al. (1987) *EMBO J.* 6: 187-195). При использовании в клетках млекопитающих контрольные функции экспрессионного вектора обычно обеспечиваются одним или более регуляторных элементов. Например, обычно используемые промоторы происходят из вируса полиомы, аденовируса 2, цитомегаловируса, вакуолизирующего обезьяньего вируса 40 и других, описанных здесь и известных в данной области техники. Ради других подходящих систем экспрессии как для прокариотических, так и для

эукариотических клеток смотрите, например, главы 16 и 17 Sambrook et al. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.

В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный вектор для экспрессии в клетках млекопитающих способен управлять экспрессией нуклеиновой кислоты преимущественно в конкретном типе клеток (например, тканеспецифические регуляторные элементы используются для экспрессии нуклеиновой кислоты). Тканеспецифические регуляторные элементы известны в данной области техники. Неограничивающие примеры подходящих тканеспецифических промоторов включают промотор гена альбумина (специфический для печени; Pinkert et al. (1987) *Genes Dev.* 1: 268-277), лимфоидноспецифические промоторы (Calame и Eaton 19%) *Adv. Immunol* 43: 235-275), в частности промоторы генов Т-клеточных рецепторов (Winoto and Baltimore (1989) *EMBO J.* 8: 729-733) и иммуноглобулинов (Baneiji et al. (1983) *Cell* 33: 729-740; Queen and Baltimore (1983) *Cell* 33: 741-748), нейронспецифические промоторы (например, промотор гена нейрофиламента; Byrne and Ruddle (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 5473-5477), специфические для поджелудочной железы промоторы (Edlund et al. (1985) *Science* 230: 912-916) и специфические для молочной железы промоторы (например, промотор гена молочной сыворотки; патент США с № 4873316 и публикация заявки на Европейский патент с № 264166). Также включены промоторы, регулируемые в ходе развития, например, промоторы гомеозистых генов (хокс-генов) мышей (Kessel and Grass (1990) *Science* 249: 374-379) и промотор гена  $\alpha$ -фетопротейна (Campes and Tilghman (1989) *Genes Dev.* 3: 537-546).

В некоторых вариантах осуществления регуляторный элемент функционально связан с одним или более элементов системы CRISPR для управления экспрессией одного или более элементов системы CRISPR. В целом, CRISPR (короткие палиндромные повторы, регулярно расположенные группами), также известные как SPIDR (SPacer Interspersed Direct Repeats, рассеянные среди спейсеров

прямые повторы), составляют семейство локусов ДНК, которые являются обычно специфическими для конкретного вида бактерий. Локус CRISPR включает особый класс рассеянных повторов коротких последовательностей (SSR), которые были распознаны в *E.coli* (Ishino et al. (1987) *J. Bacteriol.*, 169:5429-5433; и Nakata et al. (1989) *J. Bacteriol.*, 171:3553-3556), и связанных с ней генах. Подобные рассеянные SSR были обнаружены в *Haloferax mediterranei*, *Streptococcus pyogenes*, *Anabaena*, и *Mycobacterium tuberculosis* (Groenen et al. (1993) *Mol. Microbiol.*, 10:1057-1065; Høe et al. (1999) *Emerg. Infect. Dis.*, 5:254-263; Masepohl et al. (1996) *Biochim. Biophys. Acta* 1307:26-30; and Mojica et al. (1995) *Mol. Microbiol.*, 17:85-93). Локусы CRISPR, как правило, отличаются от других SSR структурой повторов, которые были названы короткими, разделенными регулярными промежутками повторами (SRSR) (Janssen et al. (2002) *OMICS J. Integ. Biol.*, 6:23-33; and Mojica et al. (2000) *Mol. Microbiol.*, 36:244-246). В общем, повторы представляют собой короткие элементы, которые встречаются в кластерах, которые разделены регулярными промежутками - уникальными вставочными последовательностями постоянной длины (Mojica et al. (2000) *Mol. Microbiol.*, 36:244-246). Хотя последовательности повторов высококонсервативны между штаммами, число рассеянных повторов и последовательностей спейсерных областей, как правило, отличается от штамма к штамму (van Embden et al. (2000) *J. Bacteriol.*, 182:2393-2401). Локусы CRISPR были идентифицированы у более чем 40 прокариот (например, Jansen et al. (2002) *Mol. Microbiol.*, 43:1565-1575; and Mojica et al. (2005) *J. Mol. Evol.* 60:174-82), включая, но без ограничения ими, *Aeropyrum*, *Pyrobaculum*, *Sulfolobus*, *Archaeoglobus*, *Halocarcula*, *Methanobacterium*, *Methanococcus*, *Methanosarcina*, *Methanopyrus*, *Pyrococcus*, *Picrophilus*, *Thermoplasma*, *Corynebacterium*, *Mycobacterium*, *Streptomyces*, *Aquifex*, *Porphyromonas*, *Chlorobium*, *Thermus*, *Bacillus*, *Listeria*, *Staphylococcus*, *Clostridium*, *Thermoanaerobacter*, *Mycoplasma*, *Fusobacterium*, *Azarcus*, *Chromobacterium*, *Neisseria*, *Nitrosomonas*, *Desulfovibrio*, *Geobacter*, *Myrococcus*, *Campylobacter*, *Wolinella*, *Acinetobacter*,

*Erwinia, Escherichia, Legionella, Methylococcus, Pasteurella, Photobacterium, Salmonella, Xanthomonas, Yersinia, Treponema* и *Thermotoga*.

В общем, «система CRISPR» в совокупности относится к транскриптам и другим элементам, участвующим в экспрессии или управлении активностью связанных с CRISPR генов («Cas»), включая кодирующие ген Cas последовательности, последовательность-проводник (также называемую «спейсером» в контексте эндогенной системы CRISPR) или другие последовательности и транскрипты из локуса CRISPR. В некоторых вариантах осуществления один или более элементов системы CRISPR происходят из системы CRISPR типа I, типа II или типа III. В некоторых вариантах осуществления один или более элементов системы CRISPR происходят из конкретного организма, содержащего эндогенную систему CRISPR, такого как *Streptococcus pyogenes*. В общем, система CRISPR характеризуется элементами, которые способствуют образованию комплекса CRISPR в месте последовательности-мишени (также называемой протоспейсером в контексте эндогенной системы CRISPR).

В контексте образования комплекса CRISPR «последовательность-мишень» относится к последовательности, для обеспечения комплементарности с которой предназначена последовательность-проводник, причем гибридизация между последовательностью-мишенью и последовательностью-проводником способствует образованию комплекса CRISPR. Полная комплементарность требуется необязательно при условии, что существует достаточная комплементарность, чтобы вызвать гибридизацию и способствовать образованию комплекса CRISPR. Последовательность-мишень может включать любой полинуклеотид, такой как полинуклеотиды в виде ДНК или РНК. В некоторых вариантах осуществления последовательность-мишень расположена в ядре или цитоплазме клетки. В некоторых вариантах осуществления последовательность-мишень может находиться в органелле эукариотической клетки, например, митохондрии или хлоропласте. Последовательность или шаблон, которая может использоваться для рекомбинации внутри таргетируемого локуса, включающего

последовательности-мишени, называют «редактирующим шаблоном» или «редактирующим полинуклеотидом» или «редактирующей последовательностью». В некоторых аспектах раскрываемого сейчас предмета изобретения экзогенный шаблонный полинуклеотид может называться редактирующим шаблоном. В одном аспекте раскрываемого сейчас предмета изобретения рекомбинация представляет собой гомологичную рекомбинацию.

В некоторых вариантах осуществления вектор включает один или более сайтов встраивания, таких как последовательность распознавания рестрикционной эндонуклеазой (также называемая «сайтом клонирования»). В некоторых вариантах осуществления один или более сайтов встраивания (например, приблизительно или более чем приблизительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более сайтов встраивания) расположены выше и/или ниже одного или более элементов последовательности одного или более векторов. Когда используется множество различных последовательностей-проводников, одна экспрессионная конструкция может использоваться для нацеливания активности CRISPR на множество различных соответствующих последовательностей-мишеней в клетке. Например, один вектор может включать приблизительно или более чем приблизительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20 или более последовательностей-проводников. В некоторых вариантах осуществления может быть предоставлено, и необязательно доставлено в клетку, приблизительно или более чем приблизительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более таких векторов, содержащих последовательности-проводники.

В некоторых вариантах осуществления вектор включает регуляторный элемент, функционально связанный с кодирующей фермент последовательностью, кодирующей фермент CRISPR, такой как белок Cas. Неограничивающие примеры белков Cas включают Cas1, Cas1B, Cas2, Cas3, Cas4, Cas5, Cas6, Cas7, Cas8, Cas9 (также известный как Csn1 и Csx12), Cas10, Csy1, Csy2, Csy3, Cse1, Cse2, Csc1, Csc2, Csa5, Csn2, Csm2, Csm3, Csm4, Csm5, Csm6, Cmr1, Cmr3, Cmr4, Cmr5, Cmr6, Csb1, Csb2, Csb3, Csx17, Csx14, Csx10, Csx16, CsaX, Csx3, Csx1, Csx15, Csf1, Csf2, Csf3, Csf4, Cpf1, C2c1, Cas13a, C2c2, их гомологи или их модифицированные

варианты. Эти ферменты известны; например, аминокислотную последовательность белка Cas9 *S. pyogenes* можно найти в базе данных SwissProt под входящим номером Q99ZVV2. В некоторых вариантах осуществления немодифицированный фермент CRISPR, такой как Cas9, обладает ДНК-расщепляющей активностью. В некоторых вариантах осуществления фермент CRISPR представляет собой Cas9 и может быть Cas9 из *S. pyogenes* или *S. pneumoniae*.

В некоторых вариантах осуществления фермент CRISPR управляет расщеплением одной или обеих цепей в месте последовательности-мишени, например, внутри последовательности-мишени и/или внутри комплемента последовательности-мишени. В некоторых вариантах осуществления фермент CRISPR управляет расщеплением одной или обеих цепей в пределах приблизительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 50, 100, 200, 500 или более пар оснований от первого или последнего нуклеотида последовательности-мишени. В некоторых вариантах осуществления вектор кодирует фермент CRISPR, который является мутированным относительно соответствующего фермента дикого типа, так что мутированный фермент CRISPR не обладает способностью к расщеплению одной или обеих цепей полинуклеотида-мишени, содержащего последовательность-мишень.

В некоторых вариантах осуществления кодирующая фермент последовательность, кодирующая фермент CRISPR, является оптимизированной в отношении частоты использования кодонов для экспрессии в конкретных клетках, таких как эукариотические клетки. Эукариотические клетки могут быть клетками или происходить из конкретного организма, такого как млекопитающее, включая, но без ограничения ими, человека, мышь, крысу, кролика, собаку или не являющегося человеком примата. В общем, оптимизация в отношении частоты использования кодонов относится к процессу модификации последовательности нуклеиновой кислоты для усиления экспрессии в представляющих интерес клетках-хозяевах путем замены по меньшей мере одного кодона (например, приблизительно или более чем приблизительно 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15). 20, 25, 50 или более кодонов) нативной последовательности кодонами, которые чаще или чаще всего используются в генах этой

клетки-хозяина при сохранении нативной аминокислотной последовательности. Различные виды проявляют особое предпочтение некоторых кодонов для конкретной аминокислоты. Предпочтение кодонов (различия в использовании кодонов между организмами) часто коррелирует с эффективностью трансляции информационной РНК (мРНК), которая, как полагают, в свою очередь зависит, помимо прочего, от свойств транслируемых кодонов и наличия конкретных молекул транспортных РНК (тРНК). Преобладание выбранных тРНК в клетке, как правило, является отражением кодонов, наиболее часто используемых при синтезе пептидов. Соответственно, гены могут быть адаптированы для оптимальной экспрессии генов в данном организме на основе оптимизации частоты использования кодонов. Таблицы частот использования кодонов общедоступны, например, в «Codon Usage Database», и эти таблицы можно адаптировать несколькими способами. Смотрите Nakamura et al. (2000) *Nucl. Acids Res.* 28:292. Также доступны реализуемые ЭВМ алгоритмы для оптимизации в отношении частоты использования кодонов конкретной последовательности для экспрессии в конкретной клетке-хозяине, такие как Gene Forge (Aptagen; Jacobus, Pa.). В некоторых вариантах осуществления один или более кодонов (например, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 50 или более, или все кодоны) в последовательности, кодирующей фермент CRISPR, соответствуют наиболее часто используемым кодоном для конкретной аминокислоты.

Как правило, последовательность-проводник представляет собой любую полинуклеотидную последовательность, обладающую достаточной комплементарностью с полинуклеотидной последовательностью-мишенью для гибридизации с последовательностью-мишенью и прямого специфического для последовательности связывания комплекса CRISPR с последовательностью-мишенью. В некоторых вариантах осуществления степень комплементарности между последовательностью-проводником и соответствующей ей последовательностью-мишенью, когда они оптимально совмещены с использованием подходящего алгоритма для совмещения, составляет приблизительно или более приблизительно 50%, 60%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97,5%, 99% или более. Оптимальное совмещение может быть определено с использованием

любого подходящего алгоритма для совмещения последовательностей, неограничивающие примеры которого включают алгоритм Смита-Ватермана, алгоритм Нидлмана-Вунша, алгоритмы, основанные на преобразовании Беровсе-Вилера (например, Burrows Wheeler Aligner), ClustalW, Clustal X, BLAT, Novoalign (Novocraft Technologies, ELAND (Illumina, San Diego, Calif.), SOAP (доступный на [soap.genomics.org.cn](http://soap.genomics.org.cn)) и Maq (доступный на [maq.sourceforge.net](http://maq.sourceforge.net)). В некоторых вариантах осуществления длина последовательности-проводника составляет приблизительно или более чем приблизительно 5, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 75 или более нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления длина последовательности-проводника составляет менее чем приблизительно 75, 50, 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15, 12 или менее нуклеотидов.

Способность последовательности-проводника к управлению специфическим для последовательности связыванием комплекса CRISPR с последовательностью-мишенью может быть оценено с помощью любого подходящего анализа. Например, компоненты системы CRISPR, достаточные для образования комплекса CRISPR, включая последовательность-проводника, подлежащую исследованию, могут предоставляться клетке-хозяину, имеющей соответствующую последовательность-мишень, например, путем трансфекции с использованием векторов, кодирующих компоненты последовательности CRISPR, с последующей оценкой преимущественного расщепления внутри последовательности-мишени, например, с помощью анализа Surveyor, описанного здесь. Точно так же расщепление полинуклеотидной последовательности-мишени может быть оценено в пробирке путем обеспечения последовательности-мишени, компонентов комплекса CRISPR, включая последовательность-проводника, подлежащую исследованию, и контрольную последовательность-проводника, отличную от исследуемой последовательности-проводника, и сравнения связывания или скорости расщепления в последовательности-мишени между реакциями с использованием исследуемой и контрольной последовательностей-проводников. Другие анализы возможны и будут

известны специалистам в данной области техники.

Последовательность-проводник может быть выбрана для нацеливания на любую последовательность-мишень. В некоторых вариантах осуществления последовательность-мишень представляет собой последовательность в геноме клетки. Приводимые в качестве примера последовательности-мишени включают последовательности, которые являются уникальными в геноме-мишени. Например, в некоторых вариантах осуществления последовательность-мишень в случае LCA выбирают из группы, состоящей из SEQ ID NO:1, 2, 3, 4, 5 и 6; или их комбинаций. SEQ ID NO:1, 2, 3, 4, 5 и 6 или их комбинации могут привести к делеции размером ~1 т.о. - удалению криптоического экзона D из CEP290. Сочетание SEQ ID NO:1, 2, 3, 4, 5 и 6 с модифицированной формой Cas9, такой как никаза (эндонуклеаза) D10A, может обеспечить безопасный и эффективный терапевтический подход. Приводимая в качестве примера конструкция saCas9 с четырьмя gRNA представлена в SEQ ID NO: 110. Дополнительные последовательности-мишени в случае LCA могут быть выбраны из нуклеотидных последовательностей, представленных в SEQ ID NO:7-109. В некоторых вариантах осуществления последовательности-мишени в случае ADRP выбирают из группы, состоящей из SEQ ID NO:111-126 или их комбинаций. В некоторых вариантах осуществления последовательности gRNA в случае ADRP выбирают из группы, состоящей из SEQ ID NO:127-142, или их комбинаций. В некоторых вариантах осуществления мутации-мишени в случае глаукомы включают, но без ограничения ими, OPTN, TBK1, TMC01, PMM2, GMDS, GAS7, FNDC3B, TXNRD2, ATXN2, CAV1/CAV2, p16INK4a, SIX6, ABCA1, AFAP1 и CDKN2B-AS. В некоторых вариантах осуществления последовательности-мишени в случае глаукомы выбирают из группы, состоящей из SEQ ID NO:143-163, или их комбинаций. В некоторых вариантах осуществления способов лечения глаукомы не встречающаяся в природе система CRISPR включает промотор H1 для экспрессии слияния mCherry-гистон 2b в направлении Pol II в сочетании с по меньшей мере одной gRNA, например, направленной на *Dlk*, *Lzk* или другие вышерасположенные или нижерасположенные компоненты пути выживания RGC,

идентифицированные с использованием предусмотренных здесь методов скрининга.

В некоторых вариантах осуществления последовательность-мишень может быть гомологична на 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8% нуклеотидным последовательностям, представленным в SEQ ID NO:1-738 или 788-1397.

Термин «гомологичный» относится к «% гомологии» и используется здесь взаимозаменяемо с термином «% идентичности», и относится к уровню идентичности последовательностей нуклеиновых кислот при совмещении с использованием программы для совмещения последовательностей.

Например, как здесь используется, 80% гомология означает то же самое, что и 80% идентичность последовательностей, определенная с использованием определенного алгоритма, и, соответственно, гомолог данной последовательности имеет идентичность последовательности, превышающую 80%, по всей длине данной последовательности. Приводимые в качестве примера уровни идентичности последовательности включают, но без ограничения этим, приблизительно 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,7%, 99,8% или более идентичности последовательности с нуклеотидными последовательностями, представленными в SEQ ID NO:1-1400.

В некоторых вариантах осуществления фермент CRISPR является частью слитого белка, включающего один или более доменов гетерологичного белка (например, приблизительно или более чем приблизительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более доменов в дополнение к ферменту CRISPR). Белок слияния с ферментом CRISPR может включать любую дополнительную последовательность белка и, необязательно, линкерную последовательность между любыми двумя доменами. Примеры белковых доменов, которые могут быть слиты с ферментом CRISPR, включают, без ограничения, эпитопные метки, последовательности репортерных генов и белковые домены, обладающие одной или более из следующих активностей: метилазной

активностью, деметилазной активностью, активностью активации транскрипции, активностью репрессии транскрипции, активностью фактора отделения транскрипта, активностью модификации гистонов, РНК-расщепляющей активностью и активностью связывания нуклеиновых кислот. Неограничивающие примеры эпитопных меток включают гистиридиновые (His) метки, V5-метки, FLAG-метки, метки на основе гемагглютинаина (HA) вируса гриппа, Мус-метки, VSV-G-метки и тиоредоксиновые (Trx) метки. Примеры генов-репортеров включают, но без ограничения ими, глутатион-S-трансферазу (GST), пероксидазу хрена (HRP), хлорамфеникол-ацетилтрансферазу (CAT), бета-галактозидазу, бета-глюкурониазу, люциферазу, зеленый флуоресцентный белок (GFP), HcRed, DsRed, голубой флуоресцентный белок (CFP), желтый флуоресцентный белок (YFP) и аутофлуоресцентные белки, включая синий флуоресцентный белок (BFP). Фермент CRISPR может быть слит с последовательностью гена, кодирующей белок или фрагмент белка, которые связываются с молекулами ДНК или связываются с другими клеточными молекулами, включая, но без ограничения этим, мальтозосвязывающий белок (MBP), S-метку, слияния с ДНК-связывающим доменом (DBD) Lex A, слияния с ДНК-связывающим доменом GAL4A и слияния с белком VP16 вируса простого герпеса (HSV). Дополнительные домены, которые могут образовывать часть слитого белка, включающего фермент CRISPR, описаны в заявке US20110059502, которая включена сюда посредством ссылки. В некоторых вариантах осуществления меченый фермент CRISP используется для определения местоположения последовательности-мишени.

В одном аспекте раскрываемого сейчас предмета изобретения ген-репортер, который включает, но без ограничения ими, глутатион-S-трансферазу (GST), пероксидазу хрена (HRP), хлорамфеникол-ацетилтрансферазу (CAT), бета-галактозидазу, бета-глюкурониазу, люциферазу, зеленый флуоресцентный белок (GFP), HcRed, DsRed, голубой флуоресцентный белок (CFP), желтый флуоресцентный белок (YFP) и аутофлуоресцентные белки, включая синий флуоресцентный белок (BFP), может быть введен в клетку для кодирования продукта гена, который служит в качестве маркера, с помощью которого можно определить изменение или модификацию

экспрессии продукта гена. В дополнительном варианте осуществления раскрываемого сейчас предмета изобретения, молекула ДНК, кодирующая продукт гена, может быть введена в клетку через вектор. В предпочтительном варианте осуществления раскрываемого сейчас предмета изобретения продуктом гена является люцифераза. В дополнительном варианте осуществления раскрываемого сейчас предмета изобретения экспрессия продукта гена снижается.

Как правило, варианты осуществления промотора настоящего раскрываемого сейчас предмета изобретения включают: 1) полный промотор Pol III, который включает TATA-бокс, проксимальный элемент последовательности (PSE) и дистальный элемент последовательности (DSE); и 2) второй основной промотор Pol III, который включает PSE и TATA-бокс, слитый с 5'-концом DSE в обратной ориентации. TATA-бокс, получивший название согласно своей нуклеотидной последовательности, является основной детерминантой специфичности Pol III. Обычно он находится в положении между нуклеотидами -23 и -30 относительно транскрибируемой последовательности и является основной детерминантой начала транскрибирования последовательности. PSE обычно расположен между нуклеотидами -45 и -66. DSE усиливает активность основного промотора Pol III. В промоторе H1 нет промежутка между PSE и DSE.

Двунаправленные промоторы состоят из: 1) полного, обычного, однонаправленного промотора Pol III, который содержит 3 внешних контролирующих элемента: DSE, PSE и TATA-бокс; и 2) второй основной промотор Pol III, который включает PSE и TATA-бокс, слитые с 5'-концом DSE в обратной ориентации. TATA-бокс, который распознается TATA-связывающим белком, важен для привлечения Pol III в область промотора. Связывание TATA-связывающего белка с TATA-боксом стабилизируется взаимодействием SNAPc с PSE. Вместе эти элементы определяют правильное положение Pol III, чтобы она могла транскрибировать экспрессируемую последовательность. DSE также необходим для полной активности промотора Pol III (Murphy et al. (1992) *Mol. Cell Biol.* 12:3247-3261; Mittal et al. (1996) *Mol. Cell Biol.* 16:1955-1965; Ford and Hernandez (1997)

*J. Biol. Chem.*, 272:16048-16055; Ford et al. (1998) *Genes, Dev.*, 12:3528-3540; Hovde et al. (2002) *Genes Dev.* 16:2772-2777). Транскрипция усиливается в 100 раз благодаря взаимодействию факторов транскрипции Oct-1 и/или SBF/Staf с их мотивами в DSE (Kunkel and Nixon (1998) *Nucl. Acid Res.*, 26:1536-1543). Поскольку основные промоторы с прямой и обратной ориентацией управляют транскрипцией последовательностей на противоположных цепях двухцепочечных ДНК-матриц, плюс-цепь основного промотора с обратной ориентацией присоединена к 5'-концу минус-цепи DSE. Транскрипты, экспрессируемые под контролем промотора H1, оканчиваются непрерывной последовательностью из 4 или 5 Т.

В промоторе H1 DSE прилегает к PSE и TATA-боксу (Myslinski et al. (2001) *Nucl. Acid Res.* 29:2502-2509). С целью минимизации повторения последовательности, этот промотор был сделан двунаправленным путем создания гибридного промотора, в котором транскрипция в обратном направлении контролируется в результате добавления PSE и TATA-бокса, полученных из промотора U6. С целью облегчения конструирования двунаправленного промотора H1 небольшая спейсерная последовательность также может быть вставлена между обратно ориентированным основным промотором и DSE.

В некоторых вариантах осуществления двунаправленные промоторы включают, но без ограничения ими, H1, RPPH1-PARP2 (человека), SRP-RPS29, 7sk1-GSTA4, SNAR-G-1-CGB1, SNAR-CGB2, RMRP-CCDC107, тРНК(Lys)-ALOXE3, RNU6-9-MED16: тРНК(Gly)-DPP9, RNU6-2-THEM259 или SNORD13-C8orf41.

В некоторых вариантах осуществления промотор H1 включает нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 787.

**H1\_wt:**

GGAATTCGAACGCTGACGTCATCAACCCGCTCCAAGGAATCGCGGGCCAGTGTCАСТА  
GGCGGGAACACCCAGCGCGCGTGC GCCCTGGCAGGAAGATGGCTGTGAGGGACAGGGGAGTGGC  
GCCCTGCAАТАТТТGCATGTСGСТАТGTGTTCTGGGAAATCACСАТАAACGTGAAATGTCTTTG  
GATTTGGGAATCTTATAAGTTCTGTATGAGACСACTTTTCCС (SEQ ID NO: 787)

В некоторых вариантах осуществления ортологичные двунаправленные промоторы включают, но не ограничиваются ими,

RPPH1-PARP2 (мышь) или RPPH1-PARP2 (крысы) или те, которые происходят из *ailuropoda melanoleuca*, *bos taurus*, *callithrix jacchus*, *canis familiaris*, *cavia porcellus*, *chlorocebus sabaues*, *choloepus hoffmanni*, *dasyopus novemcinctus*, *dipodomys ordii*, *equus caballus*, *erinaceus europaeus*, *felis catus*, *gorilla gorilla*, *homo sapiens*, *ictidomys tridecemlineatus*, *loходonta africana*, *macaca mulatta*, *mus musculus*, *mustela putorius furo*, *myotis lucifugus*, *nomascus leucogenys*, *ochotona princeps*, *oryctolagus cuniculus*, *otolemur garnettii*, *ovis aries*, *pan troglodytes*, *papio anubis*, *pongo abelii*, *procavia capensis*, *pteropus vampyrus*, *rattus norvegicus*, *sus scrofa*, *tarsius syrichta*, *tupaia belangeri*, *tursiops truncatus*, *vicugna pacos*.

**Таблица 1: Примеры компактных двунаправленных промоторов**

<u>Ген ncRNA</u>	<u>Ген белка</u>	<u>Расстояние</u>
RPPH1	PARP2	230 п.о.
SRP	RPS29	233 п.о.
7sk1	GSTA4	239 п.о.
SNAR-G1	CGB1	308 п.о.
SNAR	CGB2	308 п.о.
RMRP	CCDC107	361 п.о.
тРНК (Lys)	ALOXE3	376 п.о.
RNU6-9	MED16	412 п.о.
тРНК (Gly)	DPP9	484 п.о.
SNORD13	C8orf41	847 п.о.
RNU6-2	THEM259	525 п.о.

RPPH1-PARP2 (человек) :

GGAATTCGAACGCTGACGTCATCAACCCGCTCCAAGGAATCGCGGGCCCAGTGTCACTA  
GGCGGGAACACCCAGCGCGCGTGCGCCCTGGCAGGAAGATGGCTGTGAGGGACAGGGGAGTGGC  
GCCCTGCAATATTTGCATGTCGCTATGTGTTCTGGGAAATCACCATAAACGTGAAATGTCTTTG  
GATTTGGGAATCTTATAAGTTCTGTATGAGACCACTTTTTCCC (SEQ ID NO:739)

SRP-RPS29:

CTTGCTCTCAGCAGTGCAACGAGGTAAAAGGAAGAAGCTGGCCCACGCATGCGCTCTTC  
AAATTTTTGAGACAGTTTACCCAGAATGCAGTGCTCAAAGGAAACGCGTGCGCAGTGTGGTCAG  
GTTGTTTCGCTGGGTGAGTAAAATGAAATCTTAGAGGCGTTGTGGGCTGGCCCAGTTGATGACG  
TCACCATAACCACAGCTTCTAGTGCTATTCTGCGCCGGTATCCGACC (SEQ ID NO:740)

7sk1-GSTA4:

AGTATTTAGCATGCCCCACCCATCTGCAAGGCATTCTGGATAGTGTCAAACAGCCGGA

AATCAAGTCCGTTTATCTCAAACCTTTAGCATTTTGGGAATAAATGATATTTGCTATGCTGGTTA  
 AATTAGATTTTAGTTAAATTTCTGCTGAAGCTCTAGTACGATAAGCAACTTGACCTAAGTGTA  
 AAGTTGAGACTTCCTTCAGGTTTATATAGCTTGTGCGCCGCTTGGGTACCTC (SEQ ID  
 NO:741)

SNAR-G-1- CGB1:

GTCTCTCTCTTAGCGGGATATCTTCCGCAAGCACTGGGAATGTGGACATGGAAAGTAAA  
 TTGAGTCTCCGTGGGGGAGTGAGACAGGGAGTGAGGGGTGTTGGACGCGGCACGGGAACCTGGC  
 CAGAGTCAGCGGACCCAATTGGCTGCTCTCTCTCAGATGCAGTTCCCCTTCCTCCCTCCAGGGG  
 GCGCCACGGAACGCAGGGCCCTCACTGGCCCTGGGGACTGGGTGACGTGAGGGATGAGCCTCTT  
 GTGATTGGCTCCATCACCTGCGTAAGATCAAAGGGAAGAAAGGATGGGCCCGACAA (SEQ  
 ID NO:742)

SNAR- CGB2:

GTCTCTCTCTTAGCGGGATATCTTCCGCAAGCACTGGGGATGTGGACATGGAAAGTAAA  
 TTGAGTCTCCGTGGGGGAGTGAGACAGGGAGTGAGGGGTGTTGGACGCGGCACGGGAACCCGGC  
 CGGAGTCAGCGGACCCAATTGGCTGCTCTCTCTCAGATACAGTTCCCCTTCCTCCCTCCAGGGG  
 GCGCCACGGAACGCAGGGCCCTCACTGGCCCTGGGGACTGGGTGACGTGAGGGGTGAGCCTCTC  
 CTGATTGGCTCCATCACCTGCGTAAGGTCAAAGGAAGAAAGGAGATCCCCGACAC (SEQ  
 ID NO:743)

RMRP-CCDC107:

TGCCGCCCACGGGTGGAGGGATCGGGCGGGCGGTGCCGAAGCGGTCCGGCATTGGCCG  
 GCCGCCCCAACGCGCACGCGCACGCGAGCAGGCCGGCCGGCTCCGGGGAGGCCACGCCCCTCC  
 CCGTAGGGCGGGCCAGACCATATTTGCATAAGATAGTGTCAATTCTAGCTTTCTGTATTTGTT  
 CATTTCTGTCTATTAGCTATTCTGCTAGCCACAATGCCTCTGAAAGCCTATAGTCTTAGAAAG  
 TTATGCCCGAAAACGGTTTTTTTTAATCTCACGCCACCAACTTTCTCACCCCTAATCATAAAACAC  
 AATTTCTTTAGGGCTATAAAATACTACTCTGTGAAGCTGAGGACGT (SEQ ID NO:744)

τPHK (Lys) -ALOXE3:

TCTTTCCGCTCCAGGACCGCCCTGGGCCTGCAGGATCCTGGGCGGGAGCCCAGGTGTCC  
 GGGATCTGGGCCACTAGGGACTGGGGAGGAACCTCTCAGAGAAGCCCATAGCCCGCAGCGGCCC  
 CGCGCGGGCCGGTTCCGGCGCCGCACTGTTCCAGCCTCTACTATGGTACAGTCCCTGCGTCGCAG  
 CCTCGGCGGGGGCTCTAAGAACGGGAGGCAGAAAAGCTCAATCAGCAGCAGGCGAGCTTACC  
 CGCTGCTTCCAAATCTGTGCCAAAATATTCTATGCTGCACAGATAAAATCCTCTGTCGGTTCTA  
 CAAGCCTGGCTTTTCTATAGAGAACCCTCTTATAAGCAAAAAGTAAAGCTCTCGTGAAGA  
 (SEQ ID NO:745)

RNU6-9-MED16:

GAGGGCAGTCACCAGCTCCTGGCCCGTGCGCCAAGCTCAGCGGGCGTCCGCGGTGCGAT  
 CTTCCCTAGCGCCTCGGGTCTGGCGCCGCCATCTTCTCGGTAACAACCAGTCGCCTGAGGCGT

GGGGCCGCCTCCCAAAGACTTCTGGGAGGGCGGTGCGGCTCAGGCTCTGCCCCGCCTCCGGGGC  
 TATTTGCATACGACCATTTCCAGTAATCCCAGCAGCCACCGTAGCTATATTTGGTAGAACAAAC  
 GAGCACTTTCTCAACTCCAGTCAATAACTACGTTAGTTGCATTACACATTGGGCTAATATAAAT  
 AGAGGTTAAATCTCTAGGTCATTTAAGAGAAGTCGGCCTATGTGTACAGACATTTGTTCCAGGG  
 GCTTTAAATAGCTGGTGGTGGAACTCAATATTC (SEQ ID NO:746)

τPHK(Gly)-DPP9:

TAACCGCTCAGCTGACCTCAGGAGGGCAGGGGTGCCTTCTAAAGGGTCCAGAGAGCCTC  
 CATTCCAGCTGCAGGCGTGGGACACAGACCGGGACGTGGGGCGGCGGCCGGACTGGGCAGGTCCG  
 TCCCGGGTCCAGCGGCGCCTCACGGTCGCGGCTCCATGCCCGGGACTGCGACCCCGGAAGTGGC  
 GGGAGCGGGGACGACAGCCGCGGCGGACACAGGGGACCCGCGGCTCAGGCACCTTTGACCCG  
 GAAGTTGAGCGACCCAGGCGGCGGCCTGGGATTGGACACCACCAGGCACGTACCAAGGCGTCCG  
 CGGCGCTTGGGGGGAGCCCGCGGCGGCGGCCTAAGGTGCGTAACGCCCATGAACGACATC  
 TTCCGGTGGGTTAGGGAGAGACACCCCCCTGTGACTTGGTATCACTCAGTCAAACCCATGATCC  
 CCCACTATTAAGGATATCCGGAGAGGATGCTACCTATCAGG (SEQ ID NO:747)

SNORD13-C8orf41:

TCCTGACTGCAGCACCAGAAGGCTGGTCTCTCCACAGAACGAGGATGGAGGCGGGGAG  
 GGATCCGTTGAAGAGGGAAGGAGCGATCACCCAAAGAGAACTAAAATCAAATAAAATAAAACAG  
 AGAGATGTCTTGGAGGAGGGGGCGAGTCTGACCGGGATAAGAATAAAGAGAAAGGGTGAACCCG  
 GGAGGCGGAGTTTGCAGTGAGCCGAGATCGCGCCACTGCACTCCAGCCTGGGCGACAGAGTGAG  
 ACTCCGTCTCAGTAAAAAAAAAAAAAAAAAAGAATAAAGAGGAAAGGACGCAAGAAAGGGAA  
 AGGGGACTCTCAGGGAGTAAAAGAGTCTTACACTTTTAAACAGTGACGTTAAAAGACTACTGTTG  
 CCTTTCTGAAGACTAAAAGAAAAAAACTTAAAAATTTAAAGAAATAAACTTCTGAGCCATGT  
 CACCAACTTAACCACCCCGAGGTACCTGCAACGGCTCGCGCCCGCCGGTGTCTAACAGGATCCG  
 GACCTAGCTCATATTGCTGCCGCAAAACGCAAGGCTAGCTTCCGCCAGTACTGCCGCAACACCT  
 TCTTATTTACGACGTATGGTCGTAAAGCAATAAAGATCCAGGCTCGGGAAAATGACGGAGAGG  
 TGGAACTATAGAGAATAAATTTGCATATATAATAATCCGCTCGCTAATTGTGTTTTCTGTTTTCC  
 TTTGCTAAGGTAGAAACAAAAGAATAATCACAGAATCTCAGTGGGACTTTGAAAATATCCAGGA  
 TTTTATACGTGAAGAATGGATGTATCGCATTACGGTAGTCACCCTATGTGTAAATTAGTGGCAC  
 ATACTTGGCACTCCTTAATGTCAACTATAAGATG (SEQ ID NO:748)

RNU6-2-THEM259:

GCCTCCCAGCGTCGCGCCCTAACGACCCGCAAGTGTCCGAGGGCGCCTCCCGGCCGCCA  
 TCGGCCGCCCTCGCAGCCGCGCTCTCCTCACGGCCTCCCGGCCGCCGCCATCTTCCGCTT  
 TCTCGTCCGGCTGCGGCGCTGCTGACGCTAGCGAGTCGCCACGCCGGCAAGAGCGGCCCCCT  
 GCGCCCGCAGAGAACGCTGGGATGCCAGCGGCGCCCGCGGAGGCCTCACCCCTACCTCGGCCG  
 CTCCAGGGGGCGGGCCTGCATCTGGGCCACCTCTTTTGCATATTGGCACCCACAATCCACCGCG  
 GCTATGAGGCCAGTATAAGGCGGTAAAATTACGATAAGATATGGGATTTTACGTGATCGAAGAC

ATCAAAGTAAGCGTAAGCACGAAAGTTGTTCTGCAACATACCACTGTAGGAAATTATGCTAAAT  
 ATGAAACCGACCATAAGTTATCCTAACCAAAAGATGATTTGATTGAAGGGCTTAAAATAGGTGT  
 GACAGTAACCSTTGAGTC (SEQ ID NO:749)

**Таблица 6: Примеры ортологичных двунаправленных промоторов**

<u>Ген ncRNA</u>	<u>Ген белка</u>	<u>Расстояние</u>	<u>Организм</u>
RPPH1	PARP2	230 п.о.	Человек
RPPH1	PARP2	172 п.о.	Мышь
RPPH1	PARP2	201 п.о.	Крыса

RPPH1-PARP2 (мышь) :

CGCTCTTGAAGGACGACGTCATCATCCCTTGCCCGGATGCGCGGGCTTCTTGTCTAGCA  
 CAGGAGCCTGGGGTAGAGCGCATGCAAATTACGCGCTGTGCTTTGTGGGAAATCACCCSTAAACG  
 AAAAATTTATTCCTCTTTCGAGCCTTATAGTGGCGGCCGGTCTACATCC (SEQ ID  
 NO:750)

RPPH1-PARP2 (крыса) :

GGCTGATGAGCTTCCCCGCCCCACTAGGAGTGTGAAGACCTGCCGCCATAATAAGACTC  
 CAAAAGACAGTGAATTTAACACTTACGGTGACTTCCCACAAAGCACAGCGTGAATTTGCATGC  
 GCTCTAGCCCAGGCTCCAGCTCCGGACCAGAAGCCCGCGCATCCCGGCAAAGGGTGTGACGTC  
 GTCCTTCAAGCGCT (SEQ ID NO:751)

**Таблица 7: Примеры ортологичных последовательностей H1**

**mus\_musculus**

TTCAGGATGTAGACCGGCCGCCACTATAAGGCTCGAAAGAGGAATAAATTTTTTCGTTTA  
 GGGTGATTTCCCACAAAGCACAGCGGTAATTTGCATGCGCTCTACCCCAGGCTCCTGTGCTAG  
 ACAAGAAGCCCGCGCATCCGGGCAAGGGATGATGACGTCGTCCTTCAAGAGCG (SEQ ID  
 NO:752)

**rattus\_norvegicus**

AGGAGTGTGAAGACCTGCCGCCATAATAAGACTCCAAAAGACAGTGAATTTAACACTTA  
 CGGTGACTTCCCACAAAGCACAGCGTGAATTTGCATGCGCTCTAGCCCAGGCTCCAGCTCCGG  
 ACCAGAAGCCCGCGCATCCCGGCAAAGGGTGTGACGTCGTCCTTCAAGCGCT (SEQ ID  
 NO:753)

**dipodomys\_ordii**

AGGAAAGACTTCGCTGAGGCAGACTTTATAAGGCTCCCGCGCAGAAAGAACTTTATAG  
 TTATGGTGATTTCCCACAAGCCACTGCGTCATGCAAATAAAGCAGGGTACGGCTTCCATGTACC  
 TTAAGGTTTTTTTTCTAGGCCGCGTACGCTCTGCGTATTCAGCCACGTGACCCTGAGCCAGTGGT  
 TGTGGGAGCACGTTGTGGACCTCTGCGTTTGGATTCC (SEQ ID NO:754)

**ictidomys\_tridecemlineatus**

GAAAGGGACTCCGCACAAGCAGAGTTTATAAGGCTCCCATCTGTACAGCCATTTCTCGG

TCATGGTAACTACCCACAACACACAGCGATATGCAAATATAGCAGAGCGTGTCTTCCCCGCGCGC  
 GCCTGGTCTGTCTCGGCGCCGGCGCGCTGCGTGGGGCGGAACTGTGACAGAGACCCTGCGATTCC  
 TGGGAGCTGGCTGATGACATCAGTGTCTAACCTCC (SEQ ID NO:755)

***cavia\_porcellus***

GAGAAAGAAAGGCTCAAACCTAGCCTTATAAGGCTCCCAAATGTTCGGTATATTTTTTGG  
 TTATGGTGACTIONTCCCACAATGCATAGCGATATGTAGATATTGCCAGGAGTACCTCCCACCTTCTG  
 GTCCTGTGACGCTCTTTTCTAGGACGCGCGCGCTGCAGGTTTCCAGCCTGTGATTGGGCCAGCAA  
 TTCCGGGAATGAATTGATGACGTCAGCGTTTGAATTCC (SEQ ID NO:756)

***ochotona\_princeps***

GGGGGAAGCTGGGCTCGATCAGCCTTTATAAAGCTCCAAAACTCAAGACATTTTTCTG  
 TTACGGTGGCTTCCCACAGTACACAGCGACATGCAAATAGCTTGCCAATGAATTCGCGGACCGC  
 TTCCCGCCCCGGCGCAGGCGCGCGGACGCTGTCTCCCCTGGACGCGCGCTCGCGGTTCCCGGGA  
 GCTGGCTGATGACGTTTCGGTCTCC (SEQ ID NO:757)

***oryctolagus\_cuniculus***

GGGGAGAGGTGGATCCGAACAGACTTTATAAAGCTCCGAAAGCCCAAGGCATCTTTCCC  
 TTACGGTAGCTTCCCACAAGACATAGCGACATGCAAATTTCTTGAAGTATGCTTCAGACGCGCT  
 TCTCGCCACAGCGCAAGCGCGCTGTGTGCTGACGCGGGAACGGGCCAGGGCGCGGTTCCCGGGA  
 GCGGGTTGATGACGTTAGATCTCC (SEQ ID NO:758)

***callithrix\_jacchus***

GAGGAAAAGTAGTCCCACAGACAACCTTATAAGATTCCCATACCCTAAGACATTTACGA  
 TTATGGTGACTIONTCCCAGAAGACACAGCGACATGCAAATATTGCAGGTCTGTGTTTCGCCTGTCCC  
 TCACAGTCGTCTTCTGCCAGGGCGCACGCGCGCTGGGTTTCCCGCCAACCTGACGCTGGGCTCG  
 CGATTCTTGGAGCGGGTTGATGACGTCAGCGTTTGAATTCC (SEQ ID NO:759)

***chlorocebus\_sabaeus***

GGGGAAGGGTGGTCCCTTACAGAACTTATAAGATTCCCAAACCTCAAAGACATTTACG  
 TTATGGTGACTIONTCCCAGAAGACATAGCGACATGCAAATATTGCAGGGCGTCACACCCCTCTCCC  
 TCACAGTCATCTTCTGCCAGGGCGCACGCGCGCTGGGTGTTCTCGCGTAGTGACACTGGGCCC  
 GCGATTCTTGGAGCGGGTTGATGACGTCAGCGTTTGAATTCC (SEQ ID NO:760)

***macaca\_mulatta***

GGGGAAGGGTGGTCCACACAGAACTTATAAGATTCCCATACTCAAAGACATTTCTCGT  
 TTATGGTGACTIONTCCCAGAAGACACAGCGACATGCAAATATTGTAGGGCGTCACACCCCTGTCCC  
 TCACAGTCATCTTCTGCCAGGGCGCACGCGCGCTGGGTGTTCCCGCGTAGTGACACTGGGCCC  
 GCGATTCTTGGAGCGGGTTGATGACGTCAGCGTTTGAATTCC (SEQ ID NO:761)

***papio\_anubis***

GGGGAAGGGTGGTACCATACAGAACTTATAAGATTCCCATACTCAAAGACATTTACGA  
 TTATGGTGACTIONTCCCAGAAGACACAGCGACATGCAAATATTGTAGGGCGTCACACCCCTGTCC

CTCACAGTCATCTTCCTGCCAGGGCGCACGCGCGCTGGGTGTTCCCGCGTAGTGACACTGGGCC  
CGCGATTTCCTTGGAGCGGGTTGATGACGTCAGCGTTCGAATTCC (SEQ ID NO: 762)

**gorilla\_gorilla**

GGGAAAGGGTGGTCCCACACAGAACTTATAAGACTCCCATATCCAAAGACATTTACGG  
TTATGGTGATTTCCAGAACACATAGCGACATGTAAATATTGCAGGGCGCCACTCCCCAGTCCC  
TCACAGCCATCTTCCTGCCAGGGCGCACGCGCGCTGGGTGTTCCCGCCTAGTGACACTGGGCCC  
GCGATTTCCTTGGAGCGGGTTGATGACGTCAGCGTTCGAATTCC (SEQ ID NO:763)

**homo\_sapiens**

GGGAAAAGTGGTCTCATAACAGAACTTATAAGATTCCCAAATCCAAAGACATTTACGT  
TTATGGTGATTTCCAGAACACATAGCGACATGCAAATATTGCAGGGCGCCACTCCCCTGTCCC  
TCACAGCCATCTTCCTGCCAGGGCGCACGCGCGCTGGGTGTTCCCGCCTAGTGACACTGGGCCC  
GCGATTTCCTTGGAGCGGGTTGATGACGTCAGCGTTCGAATTCC (SEQ ID NO:764)

**pan\_troglodytes**

GGGAAAGGGTGGTGCCACACAGAACTTATAAGATTCCCATATGCAAAGACATTTACGT  
TTATGGTGATTTCCAGAACACATAGCGACATGCAAATATTGCAGGGCGCCACTCCCCTGTCCC  
TCACTGCCATCTTCCTGCCAGGGCGCACGCGCGCTGGGTGTTCCCGCCTAGTGACACTGGGCCC  
GCGATTTCCTTGGAGCGGGTTGATGACGTCAGCGTTCGAATTCC (SEQ ID NO:765)

**pongo\_abelii**

GAGAAAGGGTGGTCCCGTCCAGAACTTATAAGATTCCCATACCCAAAGACATTTACGT  
TTATGGTGACTTCCAGAAATGCATAGCGACATGCAAATATTGCAGGGCGTCACTCCCCTGTCCC  
TCACAGCCATCTTCCTGCCAGGGCGCCCGCGCGCTGGTGTTCCCGCCTAGTGACACTGGGCCCA  
CGATTTCCTTGGAGCGGGTTGATGACGTCAGCGCTCGTATTCC (SEQ ID NO:766)

**nomascus\_leucogenys**

GGGAAAAGTAGTAGACCTTATAAGATTCCCAAACCCAAAGACATTTCTCGTTTATGGT  
GACTTCCAGAAAGACATAGCGACATGCAAATATTGCAGGGCGCCACTCCCCTGTCCCTCACAGC  
CATCTTCCTGCCAGGGCGCACGCGCGCTGGGTGTTCCCGCCTAGTGACACTCGGCCCGCGATTC  
CTTGGAGCGGGTTGATGACGTCAGCGTTCGAATTCC (SEQ ID NO:767)

**tarsius\_syrichta**

GCGAGAGGGTGGTCCACACAGAGCTTATAAGGTTACAAAGTAAAGATATTTACGGTG  
ACGGTGACTTCCACAATACTGCGACATGCAAATATAGCCGGGCGTGCTCCCCGATCCCGG  
AAGAGCGACTCCTAGCCAGTGCGCACGCGCGCTGCGTGTTGCGTCTAGGTGCTGGGCCCGC  
GGTTCCTGGGAGCGGGTGGTGACGTCAGCGGCCAGCTTC (SEQ ID NO:768)

**otolemur\_garnettii**

GCCTAAAAGGGCGCTTGCACAGAATTTATAAGGTTCCCAAACAGAGACACATTTCATTA  
TTATGGTGACTTCCACAATGCACAGCGCCATGCAAATATGCTAGGACGCCTCCCCCGCTACC  
TTAAGGTCGTCAACTAACCAGTGCGCGCGCGCACTGCGCGTTTCCCGCCGGTGACTCAATGCCC

GCGTTTGGTGGGAGCTAGTTGGTGACCTCAGTTCTGGAGGCTC (SEQ ID NO:769)

**tupaia\_belangeri**

GGGGAAAGCTGGGTCCACTGAGTTCTTATAAGGTTTCCAGTCCTAGAGCGATTTTACCA  
TTGCGGTGATTTCCCAGCATCCGTAGCTACATGCAAATAGCGCGGGGCGCGTCTCTCAGGTCCC  
TCCCCGCCCTCTCACTGTACGTACCCGCGTCTTAGGGACGCCGCGCCCGGGGTTCCCGGACGTC  
AGCGTTCGACGCA (SEQ ID NO:102)

**ailuropoda\_melanoleuca**

AGGGAAAGCCGCGCCTGGGGCGGATTTATAAGGCTTCCATATCTAAAGGCATTTACAG  
TCATGGTGACTTCCCACAATACATAGCAACATGCAAATATCGCGGGGAGAACCTCCCCTGTCCC  
TTGTACGCGGCTTCTAAAGACGCACGCGCGCTCTGTGTTCCCGCCCTGTGACTCTAGGCGGGCA  
ATTCCTGGGACAGTGTTCTGACGGGAACGTTTCAGGCTCC (SEQ ID NO:770)

**mustela\_putorius\_furo**

GGGAAAGGGTGGACCCACCGAGCATTTATAAGGCTCCCGCATCTAAAGACATTTTACAG  
TTATGGTGACTTCCCACAACGCGTAGCAACATGCAAATATCGTGGAGAGTACCGCCCCTGTCCC  
ATGCACGCGTCTTCTCAGCAGCACGCACGCGCGCTGTGTTCCCGCCCTGTGACTCCAGGCGGGT  
ATTTCCAGGGGCGGGTTGCTGACAGGAACGTTTCAGGCTTC (SEQ ID NO:771)

**canis\_familiaris**

GCAGCGCAGCCCTCTCGCCGCTTATAAAGTGCCGCCCGCACGGCCCTTCTCGCTCACGG  
CGACTTCCCATAACACACAGCAGCATGCAAATACCGCGGGGAGCCCCGCCCGCCCCGGCCCC  
GCACCGCCTCGGGACGCATGCGCCGGCTCTCCGTTCCCGCCTTGGGCCGGCGGGCGGGCGG  
GCGAGCGGGCGGGAGCGGCTCCGGCGGGGACGAGCGGGCGCC (SEQ ID NO:772)

**felis\_catus**

GGGAAAGGGTGGCCCCGCCGAGCATTTATAAGACTCCCATACCTAAAGACATTTCTCAG  
TTATGGTGATTTCCCACAACACACAGCAACATGCAAATATCGAGGGGTGTACCGCCCCTGTCTT  
TTGTAGACGTCTTCTCTCCAGGACGCACGCGCGCTGTATTCCCGCCTTGTGACTCTAGGCGGGC  
GATTCCTGGGAGAGGGTTGATGACGTCCAAGTTCTGGCTTC (SEQ ID NO:773)

**equus\_caballus**

GGGGAAAACAGCCCATGGCTGCATTTATAAGACTCACAGATCTAAAGCCATTTACGA  
ATAGGGTGACTTCCCACAATACACAGCGACATGCAAACATAGCGGGGCGTGCCTTTCCTGTACC  
CTGTGGGCATCTCTCCTGGACGCACGCGCGCCGGGTGTTCCCGCGCTGTGACTCTAGGCAAGCG  
CTTCCTGGGAGAGAGTTGATGACGGCAGCATTCGGGCTCC (SEQ ID NO:774)

**myotis\_lucifugus**

GGGAGAAGGAGGCGTAGAGGATATATAAGGCCCCCTTATGTGTAGTCCTTTTACGGTTA  
GGGTGACTTCCCACAACGCATAGCGACATGCAAATTTGACGGGCGTGCCTCCTCTGTCCCTGCG  
GGCAACTTCTCTCCTGGACGCGCGCGCTGCGTGTTCGGCCTTTTACTCCAGCCGAGCGAA  
TCCTGGGAGAGGGCAGGTGACGTCAACAGTCAGGCTCG (SEQ ID NO:775)

**pteropus\_vampyrus**

GCGAGAAAAATTCTTCACGCAGAATATATAAGGATCCCATATCTGAAGACATTTTACGA  
 TTACGGCGATTTCCCACAACACATAGCGACATGTAAATGTAGTGGGGCATGCCTCCCCTGTCCC  
 TTGTGGGCAGCTTCTCGCCAGAACGCACGCGGGTGCCTGTTCCCGCCTTGTGACTAAGTTGGC  
 GAGTCAGGGAGGAGATTGATGACGTCAGCTCACCCGCTCC (SEQ ID NO:776)

**bos\_taurus**

GGCAAACACCCGCACGCAAATAGCACTTATAATGTGCTCATACTAGAGCCACTTTTCGG  
 TTACGGTGACTTCTCAAAAAGACAGTGGAAACATGCAAATATTACAGTGCGTCCCGCCCCTGGTA  
 GGTCTACGCTAGGACGCACGCGCACTACGGTTCCTCGCCTATAGACTGCGCTGGCGATTCTGGG  
 AGCGGACTGATGACGTCAGCGTTCGGGATCC (SEQ ID NO:777)

**ovis\_aries**

GGCGAACAATGCGCGCAAACAGCATTTATAATGAGCTCATACTAAAGCCACTTTACGG  
 TTACGGTGACTTCCCACAAGACATTGCGGCATGCAAATATTTTAGTGCGTCCCGCCCCTGGTAG  
 TTCCACGCTAGGACGCACACGCACTACGGTTCCTCGCCTTTAGACTGCGCTGGCGATTCCAGGAG  
 CGGACTGATGACGTCAGCGTTGGGGCTCC (SEQ ID NO:778)

**tursiops\_truncatus**

GCCGAAAACCAGGCTCAAGCCACATTTATAAGGCTCCCAAATCTAAGTACATTTGTCGG  
 TTATGGTGACTTCCCGCACACATTGCGACATGCAAATACTGCGGAGCGTCCCTCCCCTGGCAA  
 CTCCTCGCTGGGACGCACGCGCGCTACGTGCTCCCGCCTTTTACTGCGCCGGCGATACTTGGG  
 AGAGGGTTGATGACGTCAGCGTTCTGGCTCC (SEQ ID NO:779)

**vicugna\_pacos**

GGGAAAGGGTGGGCTCACGCAGCCTTTATAAGACTCCCAAATCTAAAGACATTTCTCGG  
 TTATGGCGACTTCCCACAAGACATAGCGACATGCAAATACTGCAGGGCGCCGACCCGGTCCGT  
 GCAGCCATCTTTTCGGCTGGGACGCACGCGCGCTGCGTGTTCCTCGCCTGTGACTGCGCCGGCGA  
 TTACTGGGAGAGGATTGATGACGTCAACGTTTCGGGTCC (SEQ ID NO:780)

**sus\_scrofa**

GTAGGAAAACCTGCTTCTGTGAGCACTTATAAAACTCCATAAGTAGAGAGATTTTCATAG  
 TTATGGTGATTTCCATAAGACATTGCGACATGCAAATATTGTGGCGCGTTCGTCCCCGTCCGG  
 TGCAGGCAGCTTCGCTCCAGGACGCACGCGCAATACATGTTCCCGCCTTGAGACTGCGCCGGCA  
 GATTCCTAGGAAGTGGTTGATGACGTCGATGTTAGGGATCC (SEQ ID NO:781)

**erinaceus\_europaeus**

GCCTAAACCGGCTCTTTTCGACAGACTTATAAGGACCTCTTATCTTAGGACATTTTTTTTG  
 TTAGGGTAACTTCCCACGATGCATAGCGATATGTAAATATGGCGCCGCGAGTCTCTCCTAGGCG  
 TCTCCCCAGGACGCAGGCGCACTGCTTGTTCCTCGCTTAACATTGCTGATTCTGGGAGACTGCT  
 GATGACGTCAGCGTCCAGTCTAC (SEQ ID NO:782)

**choloepus\_hoffmanni**

AGAAAAAATAGTTTATGCTGGATTTATAAGATTCCCAAATCTAAAGCCATTTTCACAGT  
TACGGTGATTCCCCACTACACACGGCGATATGCAAATATAGCGGAAGTGTTCCCTGAGGCGTGGT  
AAAGCGCGCGCGCTGAGAGTTCCTGCCCTGTGGTGCTGGGCTGGAGATGCCTGAGAACTGGC  
TGATGACGGCAACGTTTCGGGCTCC (SEQ ID NO:783)

***dasypus\_novemcinctus***

AAAGCGATAGTTTTTTAAACTGGACTTATAAGGCACCCATATCTACGTATATTTTCATGG  
TTAGGGTGATTTCCACACAACATAGCGAAATGCAAATATTGGAGGGCGCTGAGGCGTGGTCGG  
GCGCAAGCGCGCTGCGACTTCCCGCCTTTCGGCCCTAGGCCCCAGATTCTGGGAGCTGGATGA  
TGACGTTGACGTTTCGGATACC (SEQ ID NO:784)

***loxodonta\_africana***

GGGAAGGAACAAATTCGTCAGGATTTATAAGACTCTCAGAGCTGTAGACATTTTCACAGT  
TAGGGCGATGTCCACAATACATAGCAACATGCAAATATTCTAGGAGGCCAGCCTCCCCGTCCG  
CGTGGTCATCTTCTCGCTAGGGCGCACGCCGCTGCGTGTTCCCGCTCTGTGACCAGGCAGGCG  
ATTCTGAGAACCGCTTGGTGACGTCAGTGTTCTGGCTCC (SEQ ID NO:785)

***procavia\_capensis***

AGGGTAAATCGGCGCTGCTCAGCATTTAAAAGAATCCCAAATGTGTCGCCATTTTACGC  
TTAGGGTGATATCCACAAGACACAGCGACATGCAAATATCGTGAGTCTCTGTTTCCCTGTCCA  
CGAGGGCGTCCCTCTCGCTGGGGCGCACGCGCGGTGTGTGTGCCCCCGTTGTGTGTTCCCGCGAT  
TCCAAAGAACTGGTTGATAACGTTAGACTTCCGGCTGC (SEQ ID NO:786)

*B. Способы*

В некоторых вариантах осуществления раскрываемый сейчас предмет изобретения также предусматривает способ изменения экспрессии одного или более продуктов генов в эукариотической клетке, причем клетка содержит молекулу ДНК, кодирующую один или более продуктов генов, при этом способ включает введение в клетку модифицированной не встречающейся в природе системы CRISPR, ранее описанной в WO 2015/195621 (которая полностью включена сюда посредством ссылки). В случае такой модификации используются определенные gRNA, которые нацелены на связанные с дегенерацией сетчатки гены, такие как, но без ограничения ими, вызывающий LCA10 ген CEP290, родопсин, киназа с двойной лейциновой застежкой-молнией (DLK), киназа с лейциновой застежкой-молнией (LZK), JNK1-3, MKK4, MKK7, ATF2, JUN, MEF2A, SOX11 или PUMA. В некоторых вариантах осуществления способ включает введение в клетку композиции, содержащей (а) не встречающуюся в природе нуклеазную систему (например, CRISPR),

включающую один или более векторов, включающих: i) промотор (например, двунаправленный промотор H1), функционально связанный с по меньшей мере одной нуклеотидной последовательностью, кодирующей РНК-проводник (gRNA) нуклеазной системы, причем gRNA гибридизуется с последовательностью-мишенью молекулы ДНК в клетке субъекта, и причем молекула ДНК кодирует один или более продуктов генов, экспрессируемых в клетке; и ii) действующий в клетке регуляторный элемент, функционально связанный с нуклеотидной последовательностью, кодирующей нацеленную на геном нуклеазу (например, белок Cas9), причем компоненты (i) и (ii) расположены в одном и том же или разных векторах системы, причем gRNA нацеливается и гибридизуется с последовательностью-мишенью, а нуклеаза расщепляет молекулу ДНК с изменением экспрессии одного или более продуктов генов. В некоторых вариантах осуществления система упакована в одну частицу ассоциированного вируса (AAV). В некоторых вариантах осуществления аденоассоциированный вирус (AAV) может включать любой из 51 серотипа аденовируса человека (например, серотипы 2, 5 или 35). В некоторых вариантах осуществления система инактивирует один или более продуктов генов. В некоторых вариантах нуклеазная система вырезает по меньшей мере одну мутацию гена. В некоторых вариантах осуществления промотор включает: а) контрольные элементы, которые обеспечивают транскрипцию в одном направлении по меньшей мере одной нуклеотидной последовательности, кодирующей gRNA; и б) контрольные элементы, которые обеспечивают транскрипцию в противоположном направлении нуклеотидной последовательности, кодирующей нацеленную на геном нуклеазу. В некоторых вариантах осуществления белок Cas9 является оптимизированным в отношении частоты использования кодонов для экспрессии в клетке. В некоторых вариантах осуществления промотор функционально связан с по меньшей мере одной, двумя, тремя, четырьмя, пятью, шестью, семью, восемью, девятью или десятью gRNA. В некоторых вариантах осуществления последовательность-мишень представляет собой мутацию в гене CEP290 (например, вызывающем LCA10 гене CEP290). В некоторых вариантах осуществления последовательность-мишень для CEP290

выбирают из группы, состоящей из нуклеотидных последовательностей, представленных в SEQ ID NO:1-109, 164-356, 735-738, или их комбинаций. В некоторых вариантах осуществления последовательность-мишень включает SEQ ID NO:1, 2, 3 и 4, функционально связанные. В некоторых вариантах осуществления вектор включает нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO:110. В некоторых вариантах осуществления один или более продуктов генов представляют собой родопсин. В некоторых вариантах осуществления последовательность-мишень представляет собой мутацию в гене родопсина. В некоторых вариантах осуществления последовательность-мишень представляет собой мутацию в R135 гена родопсина (например, R135G, R135W, R135L). В некоторых вариантах осуществления последовательность-мишень для R135 родопсина выбирают из группы, состоящей из нуклеотидных последовательностей, представленных в SEQ ID NO:111-126, или их комбинаций. В некоторых вариантах осуществления последовательность gRNA для R135 родопсина выбирают из группы, состоящей из нуклеотидных последовательностей, представленных в SEQ ID NO:127-142, или их комбинаций. В некоторых вариантах осуществления один или более продуктов генов представляют собой киназу с двойной лейциновой застежкой-молнией (DLK), киназу с лейциновой застежкой-молнией (LZK), JNK1-3, MKK4, MKK7, ATF2, JUN, MEF2A, SOX11 или PUMA или их комбинации. В некоторых вариантах осуществления мишени-мутации в случае глаукомы включают, но без ограничения ими, OPTN, TBK1, TMC01, PMM2, GMDS, GAS7, FNDC3B, TXNRD2, ATXN2, CAV1/CAV2, p16INK4a, SIX6, ABCA1, AFAP1 и CDKN2B-AS. В некоторых вариантах осуществления последовательность-мишень в случае глаукомы выбирают из группы, состоящей из нуклеотидных последовательностей, представленных в SEQ ID NO:143-163, или их комбинаций.

В некоторых вариантах осуществления раскрываемый сейчас предмет также предусматривает способ изменения экспрессии одного или более продуктов генов в клетке, причем клетка содержит молекулу ДНК, кодирующую один или более продуктов генов, при этом способ включает введение в клетку не встречающейся в природе системы CRISPR, включающей один или более векторов,

включающих: а) промотор H1, функционально связанный с по меньшей мере одной нуклеотидной последовательностью, кодирующей РНК-проводник (gRNA) системы CRISPR, причем gRNA гибридизуется с последовательностью-мишенью молекулы ДНК; и б) действующий в клетке регуляторный элемент, функционально связанный с нуклеотидной последовательностью, кодирующей белок Cas9, причем компоненты (а) и (б) расположены в одном и том же или разных векторах системы, причем gRNA нацеливается и гибридизуется с последовательностью-мишенью, а белок Cas9 расщепляет молекулу ДНК с изменением экспрессии одного или более продуктов генов.

В некоторых вариантах осуществления раскрываемый сейчас предмет также предусматривает способ изменения экспрессии одного или более продуктов генов в эукариотической клетке, причем клетка содержит молекулу ДНК, кодирующую один или более продуктов генов, при этом способ включает введение в клетку не встречающейся в природе системы CRISPR, включающей один или более векторов, включающих: а) промотор H1, функционально связанный с по меньшей мере одной нуклеотидной последовательностью, кодирующей РНК-проводник (gRNA) системы CRISPR, причем gRNA гибридизуется с последовательностью-мишенью молекулы ДНК; и б) действующий в эукариотической клетке регуляторный элемент, функционально связанный с нуклеотидной последовательностью, кодирующей белок Cas9 типа II, причем компоненты (а) и (б) расположены в одном и том же или в разных векторах системы, в результате чего gRNA нацеливается и гибридизуется с последовательностью-мишенью, а белок Cas9 расщепляет молекулу ДНК, в результате чего изменяется экспрессия одного или более продуктов генов. В одном аспекте последовательность-мишень может представлять собой последовательность-мишень, которая начинается с любого нуклеотида, например, N<sub>20</sub>NGG. В некоторых вариантах осуществления последовательность-мишень включает нуклеотидную последовательность AN<sub>19</sub>NGG. В некоторых вариантах осуществления последовательность-мишень включает нуклеотидную последовательность GN<sub>19</sub>NGG. В некоторых вариантах осуществления последовательность-мишень включает нуклеотидную

последовательность  $CN_{19}NGG$ . В некоторых вариантах осуществления последовательность-мишень включает нуклеотидную последовательность  $TN_{19}NGG$ . В некоторых вариантах осуществления последовательность-мишень включает нуклеотидную последовательность  $AN_{19}NGG$  или  $GN_{19}NGG$ . В другом аспекте белок Cas9 является оптимизированным в отношении частоты использования кодонов для экспрессии в клетке. В еще одном аспекте белок Cas9 является оптимизированным в отношении частоты использования кодонов для экспрессии в эукариотической клетке. В дополнительном аспекте эукариотическая клетка представляет собой клетку млекопитающего или человека. В другом аспекте экспрессия одного или более продуктов генов снижается.

Раскрываемый сейчас предмет изобретения также предусматривает способ изменения экспрессии одного или более продуктов генов в эукариотической клетке, причем клетка содержит молекулу ДНК, кодирующую один или более продуктов генов, при этом способ включает введение в клетку не встречающейся в природе системы CRISPR, включающей вектор, включающий двунаправленный промотор H1, причем двунаправленный промотор H1 включает: а) контрольные элементы, которые обеспечивают транскрипцию в одном направлении по меньшей мере одной нуклеотидной последовательности, кодирующей РНК-проводник (gRNA) системы CRISPR, причем gRNA гибридизуется с последовательностью-мишенью молекулы ДНК; и б) контрольные элементы, которые обеспечивают транскрипцию в противоположном направлении нуклеотидной последовательности, кодирующей белок Cas9 типа II, в результате чего gRNA нацеливается и гибридизуется с последовательностью-мишенью, а белок Cas9 расщепляет молекулу ДНК, в результате чего экспрессия одного или более продуктов генов изменяется. В одном аспекте последовательность-мишень может представлять собой последовательность-мишень, которая начинается с любого нуклеотида, например,  $N_{20}NGG$ . В некоторых вариантах осуществления последовательность-мишень включает нуклеотидную последовательность  $AN_{19}NGG$ . В некоторых вариантах осуществления последовательность-мишень включает нуклеотидную последовательность  $GN_{19}NGG$ . В некоторых вариантах осуществления

последовательность-мишень включает нуклеотидную последовательность CN<sub>19</sub>NGG. В некоторых вариантах осуществления последовательность-мишень включает нуклеотидную последовательность TN<sub>19</sub>NGG. В другом аспекте последовательность-мишень включает нуклеотидную последовательность AN<sub>19</sub>NGG или GN<sub>19</sub>NGG. В другом аспекте белок Cas9 является оптимизированным в отношении частоты использования кодонов для экспрессии в клетке. В еще одном аспекте белок Cas9 является оптимизированным в отношении частоты использования кодонов для экспрессии в эукариотической клетке. В дополнительном аспекте эукариотическая клетка представляет собой клетку млекопитающего или человека. В другом аспекте экспрессия одного или более продуктов генов снижается.

В некоторых аспектах раскрываемый сейчас предмет изобретения предусматривает способы, включающие доставку одного или более полинуклеотидов, например, одного или более векторов, описанных здесь, одного или более транскриптов с них и/или одного или более транскрибированных с них белков в клетку-хозяина. В некоторых аспектах раскрываемый сейчас предмет изобретения, кроме того, предусматривает клетки, получаемые такими способами, и организмы (такие как животные, растения или грибы), содержащие или полученные из таких клеток. В некоторых вариантах осуществления фермент CRISPR в сочетании с (и необязательно в комплексе с) последовательностью-проводником доставляется в клетку. Традиционные способы переноса генов на вирусной и невирусной основе могут использоваться для введения нуклеиновых кислот в клетки млекопитающих или целевые ткани. Такие способы могут использоваться для введения нуклеиновых кислот, кодирующих компоненты системы CRISPR, в клетки в культуре или в организме хозяина. Системы доставки на основе невирусных векторов включают ДНК-плазмиды, РНК (например, транскрипт с описанного здесь вектора), голую нуклеиновую кислоту и нуклеиновую кислоту в комплексе с носителем для доставки, таким как липосома. Системы доставки на основе вирусных векторов включают ДНК- и РНК-содержащие вирусы, которые имеют либо эписомные, либо интегрированные геномы после доставки

в клетку. Для обзора процедур генной терапии смотрите Anderson (1992) *Science* 256:808-813; Nabel and Felgner (1993) *TIBTECH* 11:211-217; Mitani and Caskey (1993) *TIBTECH* 11:162-166; Dillon (1993) *TIBTECH* 11:167-175; Miller (1992) *Nature* 357:455-460; Van Brunt (1998) *Biotechnology* 6(10): 1149-1154; Vigne (1995) *Restorative Neurology and Neuroscience* 8:35-36; Kremer and Perricaudet (1995) *British Medical Bulletin* 51(1):31-44; Haddada et al. (1995) *Current Topics in Microbiology and Immunology*. Doerfler and Bohm (eds); и Yu et al. (1994) *Gene Therapy* 1:13-26.

Способы невирусной доставки нуклеиновых кислот включают липофекцию, нуклеофекцию, микроинъекцию, баллистическую трансфекцию, виросомы, липосомы, иммунолипосомы, конъюгаты поликатион: или липид:нуклеиновая кислота, «голую» ДНК, искусственные вирионы и усиленное агентами поглощение ДНК. Липофекция описана, например, в патентах США с №№ 5049386, 4946787; и 4897355, и реагенты для липофекции продаются (например, Transfectam™ и Lipofectin™). Катионные и нейтральные липиды, которые подходят для эффективной липофекции полинуклеотидов с использованием распознавания рецепторов, включают таковые Feigner, WO 91/17424; WO 91/16024. Доставка может осуществляться в клетки (например, введение *in vitro* или *ex vivo*) или в целевые ткани (например, введение *in vivo*).

Получение комплексов липид:нуклеиновая кислота, включая целенаправленные липосомы, такие как иммунолипидные комплексы, хорошо известно специалисту в данной области техники (например, Crystal (1995) *Science* 270:404-410; Blaese et al. (1995) *Cancer Gene Ther.* 2:291-297; Behr et al. (1994) *Bioconjugate Chem.* 5:382-389; Remy et al. (1994) *Bioconjugate Chem.* 5:647-654; Gao et al. (1995) *Gene Therapy* 2:710-722; Ahmad et al. (1992) *Cancer Res.* 52:4817-4820; патенты США с №№ 4186183, 4217344, 4235871, 4261975, 4485054, 4501728, 4774085, 4837028 и 446787).

При использовании систем на основе РНК- или ДНК-содержащих вирусов для доставки нуклеиновых кислот используются преимущества очень сформировавшихся в процессе эволюции способов

нацеливания вируса на специфические клетки в организме и переноса вирусной массы в ядро. Вирусные векторы могут непосредственно вводиться пациентам (*in vivo*), или они могут использоваться для обработки клеток *in vitro*, и модифицированные клетки могут необязательно вводиться пациентам (*ex vivo*). Традиционные системы на основе вирусов могут включать ретровирусные, лентивирусные, аденовирусные, аденоассоциированные вирусные векторы и векторы на основе вируса простого герпеса для переноса генов. Интеграция в геном хозяина возможна с помощью способов переноса генов с использованием ретровирусов, лентивирусов и аденоассоциированных вирусов, что часто приводит к длительной экспрессии встроенного трансгена. Кроме того, высокая эффективность трансдукции наблюдалась во многих различных типах клеток и целевых тканях.

Тропизм ретровируса может быть изменен путем включения чужеродных белков оболочки, расширяя потенциальную целевую популяцию клеток-мишеней. Лентивирусные векторы представляют собой ретровирусные векторы, которые способны трансдуцировать или инфицировать неделящиеся клетки и обычно продуцируют высокие титры вирусов. Следовательно, выбор ретровирусной системы для переноса генов будет зависеть от целевой ткани. Ретровирусные векторы состоят из *cis*-действующих длинных концевых повторов (LTR) с пакующей емкостью до 6-10 т.о. чужеродной последовательности. Минимальные *cis*-действующие LTR достаточны для репликации и упаковки векторов, которые затем используются для интеграции терапевтического гена в клетку-мишень для обеспечения постоянной экспрессии трансгена. Широко используемые ретровирусные векторы включают векторы на основе вируса лейкоза мыши (MuLV), вируса лейкоза гиббонов (GaLV), вируса иммунодефицита обезьян (SIV), вируса иммунодефицита человека (ВИЧ) и их комбинаций (например, Buchscher et al. (1992) *J. Virol.* 66:2731-2739; Johann et al. (1992) *J. Virol.* 66:1635-1640; Somnerfelt et al. (1990) *J. Virol.* 176:58-59; Wilson et al. (1989) *J. Virol.* 63:2374-2378; Miller et al. (1991) *J. Virol.* 65:2220-2224; PCT/US94/05700). В приложениях, когда предпочтительна транзиторная экспрессия, могут использоваться

системы на основе аденовируса. Векторы на основе аденовируса способны к очень высокой эффективности трансдукции во многих типах клеток и не требуют деления клеток. В случае таких векторов были получены высокие титры и уровни экспрессии. Этот вектор может быть получен в больших количествах в относительно простой системе. Векторы на основе аденоассоциированного вируса («AAV») также могут использоваться для трансдукции клеток нуклеиновыми кислотами-мишенями, например, при получении нуклеиновых кислот и пептидов *in vitro*, и для процедур генной терапии *in vivo* и *ex vivo* (например, West et al. (1987) *Virology* 160:38-47; U.S. Pat. No. 4,797,368; WO 93/24641; Kotin (1994) *Human Gene Therapy* 5:793-801; Muzyczka (1994) *J. Clin. Invest.* 94:1351). Конструирование рекомбинантных AAV векторов описано в ряде публикаций, в том числе в патенте США № 5173414; Tratschin et al. (1985) *Mol. Cell. Biol.* 5:3251-3260; Tratschin et al. (1984) *Mol. Cell. Biol.* 4:2072-2081; Hermonat and Muzyczka (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 81:6466-6470; and Samulski et al. (1989) *J. Virol.* 63:03822-3828.

Упаковывающие клетки, как правило, используются для образования вирусных частиц, способных к инфицированию клетки-хозяина. Такие клетки включают клетки 293, которые упаковывают аденовирус, и клетки  $\psi$ 2 или клетки RA317, которые упаковывают ретровирус. Вирусные векторы, используемые в генной терапии, обычно получают путем создания линии клеток, которая упаковывает НК-вектор в вирусную частицу. Векторы, как правило, включают минимальные вирусные последовательности, необходимые для упаковки и последующей интеграции в хозяина, при этом другие вирусные последовательности заменяются кассетой для экспрессии полинуклеотида(ов), который должен быть экспрессирован. Недостающие вирусные функции, как правило, поставляются транзиторно с помощью упаковывающей клеточной линии. Например, векторы AAV, используемые в генной терапии, содержат, как правило, только последовательности ITR из генома AAV, которые необходимы для упаковки и интеграции в геном хозяина. Вирусная ДНК упаковывается в линии клеток, которая содержит плазмиду-

помощника, кодирующую другие гены AAV, а именно гер и сар, но без последовательностей ITR. Линия клеток также может быть инфицирована аденовирусом в качестве помощника. Вирус-помощник способствует репликации AAV вектора и экспрессии генов AAV с плазмиды-помощника. Плазида-помощник не упаковывается в значительных количествах из-за отсутствия последовательностей ITR. Загрязнение аденовирусом может быть уменьшено, например, путем тепловой обработки, к которой аденовирус является более чувствительным, чем AAV. Дополнительные способы доставки нуклеиновых кислот в клетки известны специалистам в данной области техники. Смотрите, например, US20030087817, которая включена сюда посредством ссылки.

В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин транзиторно или нетранзиторно трансфицируется одним или более векторов, описанных здесь. В некоторых вариантах осуществления трансфицируется клетка, когда она природно присутствует у субъекта. В некоторых вариантах осуществления трансфицируемая клетка берется у субъекта. В некоторых вариантах осуществления клетка происходит от клеток, взятых у субъекта, например клеточной линии. В данной области техники известен широкий ряд линий клеток для культуры ткани. Примеры линий клеток включают, но без ограничения ими, линии клеток C8161, CCRF-CEM, MOLT, mIMCD-3, NHDF, HeLa-S3, Huh1, Huh4, Huh7, HUVEC, HASMC, HEKn, HEKa, MiaPaCell, Panel, PC-3, TF1, CTLL-2, C1R, Rat6, CV1, RPTE, A10, T24, J82, A375, ARH-77, Calu1, SW480, SW620, SKOV3, SK-UT, CaCo2, P388D1, SEM-K2, WENI-231, HB56, TIB55, Jurkat, J45.01, LRMB, Bcl-1, BC-3, IC21, DLD2, Raw264.7, NRK, NRK-52E, MRC5, MEF, Hep G2, HeLa B, HeLa T4, COS, COS-1, COS-6, COS-M6A, эпителиальные клетки почки обезьяны BS-C-1, фибробласты эмбриона мыши BALB/3T3, 3T3 Swiss, 3T3-L1, фибробласты плода человека 132-d5; мышечные фибробласты 10.1, 293-T, 3T3, 721, 9L, A2780, A2780ADR, A2780cis, A172, A20, A253, A431, A-549, ALC, B16, B35, клетки BCP-1, BEAS-2B, bEnd.3, BHK-21, BR 293, BxPC3, C3H-10T1/2, C6/36, Cal-27, CHO, CHO-7, CHO-IR, CHO-K1, CHO-K2, CHO-T, CHO Dhfr-/-, COR-L23, COR-L23/CPR, COR-L23/5010, COR-L23/R23,

COS-7, COV-434, CML T1, CMT, CT26, D17, DH82, DU145, DuCaP, EL4, EM2, EM3, EMT6/AR1, EMT6/AR10.0, FM3, H1299, H69, HB54, HB55, HCA2, HEK-293, HeLa, Hepa1c1c7, HL-60, HMEC, HT-29, Jurkat, клетки JY, клетки K562, Ku812, KCL22, KG1, KYO1, LNCap, Ma-MeI 1-48, MC-38, MCF-7, MCF-10A, MDA-MB-231, MDA-MB-468, MDA-MB-435, MDCK II, MDCK II, MOR/0.2R, MONO-MAC 6, MTD-1A, MyEnd, NCI-H69/CPR, NCI-H69/LX10, NCI-H69/LX20, NCI-H69/LX4, NIH-3T3, NALM-1, NW-145, OPCN/OPCT, Peer, PNT-1A/PNT 2, RenCa, RIN-5F, RMA/RMAS, клетки Saos-2, Sf-9, SkBr3, T2, T-47D, T84, линия клеток THP1, U373, U87, U937, VCaP, Vero cells, WM39, WT-49, X63, YAC-1, YAR и их трансгенные разновидности. Линии клеток доступны из ряда источников, известных специалистам в данной области техники (смотрите, например, Американскую коллекцию типовых культур (ATCC) (Manassus, VA)). В некоторых вариантах осуществления клетка, трансфицированная одним или более векторов, описанных здесь, используется для установления новой клеточной линии, содержащей одну или более последовательностей векторного происхождения. В некоторых вариантах осуществления клетка, транзиторно трансфицированная компонентами системы CRISPR, как здесь описано (например, путем транзиторной трансфекции одного или более векторов или трансфекции РНК), и модифицированная благодаря активности комплекса CRISPR, используется для установления новой клеточной линии, содержащей клетки, включающие модификацию, но лишённые какой-либо другой экзогенной последовательности. В некоторых вариантах осуществления клетки, транзиторно или нетранзиторно трансфицированные одним или более векторов, описанных здесь, или линии клеток, происходящие от таких клеток, используются при оценке одного или более исследуемых соединений.

В некоторых вариантах осуществления один или более векторов, описанных здесь, используются для получения трансгенного животного, не являющегося человеком. В некоторых вариантах осуществления трансгенное животное представляет собой млекопитающее, такое как мышь, крыса или кролик. В некоторых вариантах осуществления организм или субъект представляет собой растение. Способы получения трансгенных животных известны в

данной области техники и обычно начинаются со способа трансфекции клеток, такого как описанный здесь способ.

В одном аспекте раскрываемый сейчас предмет изобретения предусматривает способы модификации полинуклеотида-мишени в эукариотической клетке, которая может осуществляться *in vivo*, *ex vivo* или *in vitro*. В некоторых вариантах осуществления способ включает отбор образцов клеток или популяции клеток от животного или не являющегося человеком животного и модификацию клетки или клеток. Культивирование может происходить на любой стадии *ex vivo*. Клетка или клетки могут даже быть снова введены не являющемуся человеком животному.

В одном аспекте раскрываемый сейчас предмет изобретения предусматривает способы модификации полинуклеотида-мишени в эукариотической клетке. В некоторых вариантах осуществления способ включает предоставление комплексу CRISPR возможности связаться с полинуклеотидом-мишенью для осуществления расщепления полинуклеотида-мишени, тем самым модифицируя полинуклеотид-мишень, причем комплекс CRISPR включает фермент CRISPR, образующий комплекс с последовательностью-проводником, подвергшейся гибридизации с последовательностью-мишенью внутри полинуклеотида-мишени.

В одном аспекте раскрываемый сейчас предмет изобретения предусматривает способ модификации экспрессии полинуклеотида в эукариотической клетке. В некоторых вариантах осуществления способ включает предоставление комплексу CRISPR возможности связаться с полинуклеотидом, так что связывание приводит к увеличению или уменьшению экспрессии полинуклеотида; причем комплекс CRISPR включает фермент CRISPR, образующий комплекс с последовательностью-проводником, подвергшейся гибридизации с последовательностью-мишенью внутри полинуклеотида.

В одном аспекте раскрываемый сейчас предмет изобретения предусматривает способы применения одного или более элементов системы CRISPR. Комплекс CRISPR раскрываемого сейчас предмета изобретения обеспечивает эффективное средство для модификации полинуклеотида-мишени. Комплекс CRISPR раскрываемого сейчас предмета изобретения имеет широкий ряд применения, включая

модификацию (например, делецию, вставку, транслокацию, инактивацию, активацию) полинуклеотида-мишени во множестве типов клеток. Как таковой комплекс CRISPR раскрываемого сейчас предмета изобретения имеет широкий спектр применений, например, в генной терапии, скрининге лекарственных средств, диагностике заболеваний и прогнозировании. Приводимый в качестве примера комплекс CRISPR включает фермент CRISPR, образующий комплекс с последовательностью-проводником, подвергшейся гибридизации с последовательностью-мишенью внутри полинуклеотида-мишени.

Полинуклеотид-мишень комплекса CRISPR может быть любым полинуклеотидом, эндогенным или экзогенным для эукариотической клетки. Например, полинуклеотид-мишень может представлять собой полинуклеотид, находящийся в ядре эукариотической клетки. Полинуклеотидом-мишенью может быть последовательность, кодирующая продукт гена (например, белок) или некодирующая последовательность (например, регуляторный полинуклеотид или бесполезная ДНК). Без желания быть ограниченными какой-либо теорией, считают, что последовательность-мишень должна быть связана с PAM (прилегающим к протоспейсеру мотивом), т.е. короткой последовательностью, распознаваемой комплексом CRISPR. Точные требования к последовательности и длине PAM различаются в зависимости от используемого фермента CRISPR, но PAM, как правило, представляют собой последовательности из 2-5 пар оснований, прилегающие к протоспейсеру (т.е. последовательности-мишени). Примеры последовательностей PAM приведены в разделе «Примеры» ниже, и специалист в данной области техники сможет идентифицировать дополнительные последовательности PAM для использования с данным ферментом CRISPR.

Примеры полинуклеотидов-мишеней включают последовательность, связанную с биохимическим путем передачи сигналов, например, ген или полинуклеотид, связанный с биохимическим путем передачи сигналов. Примеры полинуклеотидов-мишеней включают ассоциированный с заболеванием ген или полинуклеотид. «Ассоциированный с заболеванием» ген или полинуклеотид относится к любому гену или полинуклеотиду, который дает продукты транскрипции или трансляции на аномальном

уровне или в аномальной форме в клетках, происходящих из пораженных болезнью тканей, по сравнению с контрольными тканями или клетками без заболевания. Это может быть ген, который экспрессируется на аномально высоком уровне; это может быть ген, который экспрессируется на аномально низком уровне, причем измененная экспрессия коррелирует с возникновением и/или прогрессированием заболевания. Ассоциированный с заболеванием ген также относится к гену, обладающему мутацией(ями) или генетической вариацией, которая непосредственно ответственна за этиологию заболевания, или находится в неравновесном сцеплении с геном(ами), который ответственен за этиологию заболевания. Транскрибированные или транслированные продукты могут быть известны или неизвестны, и могут находиться на нормальном или аномальном уровне.

Варианты осуществления раскрываемого сейчас предмета изобретения также относятся к способам и композициям, имеющим отношение к нокауту генов, амплификации генов и репарации определенных мутаций, связанных с нарушениями сетчатки (Robert D. Wells, Tetsuo Ashizawa, *Genetic Instabilities and Neurological Diseases*, Second Edition, Academic Press, Oct. 13, 2011-Medical). Было установлено, что специфические особенности последовательностей тандемных повторов ответственны за более чем двадцать заболеваний человека (McIvor et al. (2010) *RNA Biol.* 7(5):551-8). Система CRISPR может быть использована для корректирования этих дефектов геномной нестабильности.

В еще одном аспекте раскрываемого сейчас предмета изобретения, система CRISPR может использоваться для корректирования дефектов сетчатки, которые возникают в результате нескольких генетических мутаций, дополнительно описанных в Traboulsi, ed. (2012) *Genetic Diseases of the Eye*, Second Edition, Oxford University Press.

## II. СПОСОБЫ ЛЕЧЕНИЯ ДЕГЕНЕРАЦИЙ СЕТЧАТКИ

Раскрываемый сейчас предмет изобретения также предусматривает способы лечения дегенераций сетчатки, таких как LCA, ADRP или глаукома. В некоторых вариантах осуществления раскрываемый сейчас предмет изобретения также предусматривает

способ лечения дегенерации сетчатки у субъекта (например, человека), нуждающегося в этом. Способ включает стадии: (a) обеспечения не встречающейся в природе нуклеазной системы (например, CRISPR), включающей один или более векторов, включающих: i) промотор (например, двунаправленный промотор H1), функционально связанный с по меньшей мере одной нуклеотидной последовательностью, кодирующей РНК-проводник (gRNA) нуклеазной системы, причем gRNA гибридизуется с последовательностью-мишенью молекулы ДНК в клетке (например, фоторецепторе или ганглиозной клетке сетчатки) субъекта, и причем молекула ДНК кодирует один или более продуктов генов, экспрессируемых в клетке; и ii) действующий в клетке регуляторный элемент, функционально связанный с нуклеотидной последовательностью, кодирующей нацеленную на геном нуклеазу (например, Cas9), причем компоненты (i) и (ii) расположены в одном и том же или разных векторах системы, причем gRNA нацеливается и гибридизуется с последовательностью-мишенью, а нуклеаза расщепляет молекулу ДНК с изменением экспрессии или инактивирует один или более продуктов генов; и (b) введения в область сетчатки субъекта терапевтически эффективного количества системы. В некоторых вариантах осуществления система упакована в одну частицу аденоассоциированного вируса (AAV) (например, AAV, AAV2, AAV9 и т.п.). В некоторых вариантах нуклеазная система вырезает по меньшей мере одну мутацию в гене. В некоторых вариантах осуществления промотор H1 включает а) контрольные элементы, которые обеспечивают транскрипцию в одном направлении по меньшей мере одной нуклеотидной последовательности, кодирующей gRNA; и б) контрольные элементы, которые обеспечивают транскрипцию в противоположном направлении нуклеотидной последовательности, кодирующей нацеленную на геном нуклеазу. В некоторых вариантах осуществления промотор функционально связан с по меньшей мере одной, двумя, тремя, четырьмя, пятью, шестью, семью, восемью, девятью или десятью gRNA. В некоторых вариантах осуществления дегенерацию сетчатки выбирают из группы, состоящей из LCA1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 и 18. В некоторых вариантах осуществления дегенерация сетчатки

представляет собой LCA10. В некоторых вариантах лечения LCA последовательность-мишень выбирают из вызывающего LCA10 гена CEP290. В некоторых вариантах лечения LCA последовательности-мишени расположены в вызывающем LCA10 гене CEP290 и выбирается из группы, состоящей из нуклеотидных последовательностей, представленных в SEQ ID NO:1-109, 164-356, 735-738 или их комбинаций (например, SEQ ID NO:1, 2, 3 и 4, функционально связанных). В некоторых вариантах лечения LCA вектор включает нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO:110. В некоторых вариантах осуществления дегенерация сетчатки представляет собой ADRP. В некоторых вариантах лечения ADRP последовательность-мишень представляет собой мутацию в гене родопсина. В некоторых вариантах лечения ADRP последовательность-мишень представляет собой мутацию в R135 гена родопсина. В некоторых вариантах осуществления мутацию в R135 выбирают из группы, состоящей из R135G, R135W, R135L. В некоторых вариантах лечения ADRP последовательность-мишень выбирают из группы, состоящей из нуклеотидных последовательностей, представленных в SEQ ID NO:111-126, или их комбинаций. В некоторых вариантах лечения ADRP последовательность gRNA выбирают из группы, состоящей из нуклеотидных последовательностей, представленных в SEQ ID NO:127-142, или их комбинаций. В некоторых вариантах осуществления дегенерация сетчатки представляет собой глаукому. В некоторых вариантах лечения глаукомы один или более продуктов генов представляют собой киназу с двойной лейциновой застежкой-молнией (DLK), киназу с лейциновой застежкой-молнией (LZK), JNK1-3, MKK4 и MKK7, ATF2, JUN, MEK2A, SOX11 или PUMA или их комбинации. В некоторых вариантах лечения глаукомы один или более продуктов генов идентифицируют с использованием скрининга на основе РНК, описанного в примере 4 ниже. В некоторых вариантах осуществления мутации-мишени в случае глаукомы включают, но без ограничения ими, OPTN, TBK1, TMC01, PMM2, GMDS, GAS7, FNDC3B, TXNRD2, ATXN2, CAV1/CAV2, p16INK4a, SIX6, ABCA1, AFAP1 и CDKN2B-AS. В некоторых вариантах лечения глаукомы последовательность-мишень выбирают из группы, состоящей из

нуклеотидных последовательностей, представленных в SEQ ID NO:143-163, или их комбинаций. В некоторых вариантах осуществления введение субъекту происходит путем имплантации, инъекции (например, субретинальной) или с использованием вирусов.

Система CRISPR может использоваться для облегчения целенаправленного редактирования генома в эукариотических клетках, включая клетки млекопитающих, такие как клетки человека. Для облегчения редактирования генома, модифицируемая клетка котрансфицируется экспрессионным вектором, кодирующим Cas9 или белок Cas9, ДНК или самой РНК вместе с самой молекулой РНК-проводника или экспрессионным вектором, включающим молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую молекулу РНК-проводника. Например, в некоторых вариантах осуществления введение Cas9 может быть осуществлено путем трансфекции Cas9 в виде белка, РНК, ДНК или экспрессионного вектора, включающего нуклеиновую кислоту, кодирующую Cas9. В некоторых вариантах осуществления ДНК проводника может сама вводиться непосредственно в виде молекулы РНК (gRNA), молекулы ДНК или в виде экспрессионного вектора, включающего нуклеиновую кислоту, кодирующую эту gRNA.

Под «дегенерацией сетчатки» подразумевается заболевание, нарушение или состояние (включая нейропатию зрительного нерва), связанное с дегенерацией или дисфункцией нейронов или других нервных клеток, таких как ганглиозные или фоторецепторные клетки сетчатки. Дегенерация сетчатки может быть любым заболеванием, нарушением или состоянием, при котором может иметь место снижение функции или дисфункция нейронов, или потеря нейронов или других нервных клеток.

Такие заболевания, нарушения или состояния включают, но без ограничения ими, глаукому, боковой амиотрофический склероз (ALS), невралгию тройничного нерва, невралгию языкоглоточного нерва, паралич лицевого нерва, тяжелую миастению, мышечную дистрофию, прогрессирующую мышечную атрофию, первичный боковой склероз (PLS), псевдобульбарный паралич, прогрессирующий бульбарный паралич, спинальную мышечную атрофию, наследственную мышечную атрофию, синдромы радикулопатии у беспозвоночных,

шейный спондилез, поражения нервных сплетений, синдромы разрушения мечевидного отростка грудины, периферические нейропатии, порфирию, болезнь Альцгеймера, болезнь Хантингтона, болезнь Паркинсона, паркинсонизм-плюс, множественную системную атрофию, прогрессирующий надъядерный паралич, кортико-базальную дегенерацию, деменцию с тельцами Леви, лобно-височную деменцию, демиелинизирующие заболевания, синдром Гийена-Барре, рассеянный склероз, болезнь Шарко-Мари-Тута, прионовые заболевания, болезнь Крейтцфельда-Якоба, синдром Герстманна-Штраусслера-Шейнкера (GSS), фатальную семейную бессонницу (FFI), губчатую энцефалопатию крупного рогатого скота (BSE), болезнь Пика, эпилепсия и комплекс СПИД-деменция.

Другие заболевания, нарушения или состояния включают, но без ограничения ими, болезнь Александра, болезнь Альпера, атаксию-телеангиэктазию, болезнь Баттена (также известную как болезнь Шпильмейера-Фогта-Шегрена-Баттена), болезнь Канавана, синдром Коккейна, диабетическую невропатию, лобно-височную лобарную дегенерацию, ВИЧ-ассоциированную деменцию, болезнь Кеннеди, болезнь Краббе, нейроборрелиоз, болезнь Мачадо-Джозефа (спиноцеребеллярную атаксию типа 3), влажную или сухую форму макулодистрофии, болезнь Ниманна-Пика, болезнь Пелицеуса-Мерцбахера, дегенеративные заболевания с потерей фоторецепторов, такие как пигментный ретинит и связанные заболевания, болезнь Рефсума, болезнь Сандхоффа, болезнь Шильдера, подострую комбинированную дегенерацию спинного мозга, вторичную по отношению к пернициозной анемии, болезнь Шпильмейера-Фогта-Шегрена-Баттена (также известную как болезнь Баттена), спиноцеребеллярную атаксию (множественные типы с различными характеристиками), болезнь Стила-Ричардсона-Ольшевского, сухотку спинного мозга, решетчатую дистрофию, пигментный ретинит, возрастную дегенерацию желтого пятна (AMD), дегенерацию с потерей фоторецепторов, связанную с влажной или сухой формой AMD, другую дегенерацию сетчатки, такую как пигментный ретинит (RP), друзы диска зрительного нерва, нейропатию зрительного нерва и неврит зрительного нерва, такой как неврит зрительного нерва, являющийся результатом рассеянного склероза.

Неограничивающие примеры различных типов глаукомы, которые можно предотвратить или лечить в соответствии с раскрываемым сейчас предметом изобретения, включают первичную глаукому (также известную как первичная открытоугольная глаукома, хроническая открытоугольная глаукома, хроническая простая глаукома и простая глаукома), глаукому низкого давления, первичную закрытоугольную глаукому (также известную как первичная закрытоугольная глаукома, узкоугольная глаукома, глаукома с блокировкой зрачка и острая застойная глаукома), острую закрытоугольную глаукому, хроническую закрытоугольную глаукому, перемежающуюся закрытоугольную глаукому, хроническую открытоугольную глаукому, пигментную глаукому, эксфолиативную глаукому (также известную как псевдоэксфолиативная глаукома или капсулярная глаукома), развивающуюся глаукому (например, первичную врожденную глаукому и инфантильную глаукому), вторичную глаукому (например, воспалительную глаукому (например, увеит и гетерохромный иридоциклит Фукса)), факогенную глаукому (например, закрытоугольную глаукому со зрелой катарактой, факоанафилактическую глаукому, вторичную по отношению к разрыву капсулы хрусталика, факолитическую глаукому вследствие факотоксической блокировки сети и подвывих хрусталика), глаукому, вторичную по отношению к гемофтальму (например, гифеме и гемолитической глаукоме, также известной как эритрокластическая глаукома), травматическую глаукому (например, глаукому с рецессией угла, травматическую рецессию угла передней камеры, послеоперационную глаукому, афакический зрачковый блок и глаукому, вызванную блоком ресничного тела) неоваскулярную глаукому, индуцированную лекарственным средством глаукому (например, индуцированную кортикостероидом глаукому и индуцированную альфа-химотрипсином глаукому), токсическую глаукому и глаукому, связанную с внутриглазными опухолями, отслойки сетчатки, серьезные химические ожоги глаза и атрофию радужной оболочки. В некоторых вариантах осуществления нейродегенеративное заболевание, нарушение или состояние представляет собой заболевание, нарушение или состояние, которое не связано с избыточным ангиогенезом, например, глаукому,

которая не является неоваскулярной глаукомой. В некоторых вариантах осуществления мутации-мишени в случае глаукомы включают, но без ограничения ими, OPTN, TBK1, TMC01, PMM2, GMDS, GAS7, FNDC3B, TXNRD2, ATXN2, CAV1/CAV2, p16INK4a, SIX6, ABCA1, AFAP1 и CDKN2B-AS.

Используемый здесь термин «нарушение», в общем, относится к любому состоянию, для которого было бы полезно лечение соединением против одной из идентифицированных мишеней или путей, включая любое заболевание, нарушение или состояние, которое можно лечить эффективным количеством соединения против одной из идентифицированных мишеней или путей или его фармацевтически приемлемой соли.

Используемый здесь термин «лечение» может включать реверсию, облегчение, подавление прогрессирования, предотвращение или снижение вероятности заболевания, нарушения или состояния, к которому применим такой термин, или одного или более симптомов или проявлений такого заболевания, нарушения или состояния (например, заболевания или нарушения, которое вызывает дисфункцию и/или гибель ганглиозных или фоторецепторных клеток сетчатки). В некоторых вариантах осуществления лечение уменьшает дисфункцию и/или гибель ганглиозных или фоторецепторных клеток сетчатки. Например, лечение может уменьшить дисфункцию и/или гибель ганглиозных или фоторецепторных клеток сетчатки на по меньшей мере 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 33%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 66%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более по сравнению с дисфункцией и/или гибелью ганглиозных или фоторецепторных клеток сетчатки у субъекта до начала лечения или у субъекта, который не подвергается лечению. В некоторых вариантах осуществления лечение полностью подавляет дисфункцию и/или гибель фоторецепторных или ганглиозных клеток сетчатки у субъекта. Используемый здесь термин «ганглиозная или фоторецепторная клетка сетчатки» представляет собой специализированный тип нейрона, обнаруживаемого в сетчатке, который способен к фототрансдукции. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один продукт гена представляет собой родопсин.

В некоторых вариантах осуществления система упаковывается в одну частицу аденоассоциированного вируса (AAV) перед введением субъекту. В некоторых вариантах осуществления введение субъекту происходит путем субретинальной инъекции. Лечение, введение или терапия могут быть последовательными или прерывистыми. Последовательное лечение, введение или терапия относится к лечению на по меньшей мере ежедневной основе, без перерыва лечения на один или более дней. Прерывистое лечение или введение, или лечение или введение останавливаемым на время образом, относится к лечению, которое не является последовательным, а скорее циклическим по природе. Лечение в соответствии с раскрываемыми сейчас способами может привести к полному облегчению или излечению от заболевания, нарушения или состояния или частичному ослаблению одного или более симптомов заболевания, нарушения или состояния и может быть временным или постоянным. Термин «лечение», как предлагается, также охватывает профилактику, терапию и лечение.

Термин «эффективное количество» или «терапевтически эффективное количество» относится к количеству агента, которое является достаточным для достижения полезных или желаемых результатов. Терапевтически эффективное количество может варьировать в зависимости от одного или более из следующего: субъекта и болезненного состояния, подвергаемого лечению, веса и возраста субъекта, тяжести болезненного состояния, способа введения и т.п., которые могут быть легко определены специалистом со средним уровнем компетентности в данной области техники. Термин также применяется к дозе, которая обеспечит изображение для обнаружения любым из способов визуализации, описанных здесь. Конкретная доза может варьировать в зависимости от одного или более из следующего: конкретного выбранного агента, схемы введения доз, которой необходимо следовать, того, вводится ли он в сочетании с другими соединениями, времени введения, ткани, подлежащей визуализации, и физической системы доставки, в который он переносится.

Термин «ингибировать» или «ингибирует» означает уменьшение, подавление, ослабление, уменьшение, остановку или стабилизацию

развития или прогрессирования заболевания, нарушения или состояния, активности биологического пути или биологической активности, например, на по меньшей мере 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, 99% или даже на 100% по сравнению с не подвергнутым лечению (обработке) контрольным субъектом, клеткой, биологическим путем или биологической активностью или по сравнению с мишенью у субъекта до лечения субъекта. Термин «уменьшение» означает ингибирование, подавление, ослабление, уменьшение, остановку или стабилизацию симптома заболевания, нарушения или состояния сетчатки. Понятно, что, хотя это и не исключается, лечение заболевания, нарушения или состояния не требует полного устранения заболевания, нарушения, состояния или симптомов, связанных с ним.

Используемое здесь выражение «фармацевтически приемлемый носитель» означает фармацевтически приемлемый материал, композицию или носитель, такой как жидкий или твердый наполнитель, разбавитель, наполнитель или материал для инкапсулирования растворителя, участвующий в переносе или транспортировке соединения настоящего изобретения из одного органа, или части тела, в другой орган, или часть тела. Каждый носитель должен быть «приемлемым» в смысле совместимости с другими ингредиентами препарата и ненанесения вреда пациенту. Некоторые примеры материалов, которые могут служить в качестве фармацевтически приемлемых носителей, включают: (1) сахара, такие как лактоза, глюкоза и сахароза; (2) крахмалы, такие как кукурузный крахмал и картофельный крахмал; (3) целлюлозу и ее производные, такие как натриевая соль карбоксиметилцеллюлозы, этилцеллюлоза и ацетат целлюлозы; (4) порошкообразный трагакант; (5) солод; (6) желатин; (7) тальк; (8) наполнители, такие как масло какао и воски для суппозиторий; (9) масла, такие как арахисовое масло, хлопковое масло, сафлоровое масло, кунжутное масло, оливковое масло, кукурузное масло и соевое масло; (10) гликоли, такие как пропиленгликоль; (11) полиолы, такие как глицерин, сорбит, маннит и полиэтиленгликоль; (12) сложные эфиры, такие как этилолеат и этиллаурат; (13) агар; (14) буферные агенты, такие как гидроксид магния и гидроксид

алюминия; (15) альгиновую кислоту; (16) апирогенную воду; (17) изотонический солевой раствор; (18) раствор Рингера; (19) этиловый спирт; (20) рН буферные растворы; (21) сложные полиэфиры, поликарбонаты и/или полиангидриды; и (22) другие нетоксичные совместимые вещества, используемые в фармацевтических препаратах.

«Фармацевтически приемлемые соли» относятся к относительно нетоксичным солям присоединения неорганических и органических кислот соединений.

Термины «предотвращать», «предотвращение», «профилактика», «профилактическое лечение» и т.п. относятся к снижению вероятности развития заболевания, нарушения или состояния у субъекта, который не имеет, но подвергается риску или подвержен развитию заболевания, нарушения или состояния.

Термины «субъект» и «пациент» используются здесь взаимозаменяемо. Субъект, подвергаемый лечению с помощью раскрываемых здесь способов во многих их вариантах осуществления, желательно является человеком, хотя следует понимать, что описанные здесь способы эффективны в отношении всех видов позвоночных, которые, как предполагается, включены в термин «субъект». Соответственно, «субъект» может включать являющегося человеком субъекта в медицинских целях, таких как лечение существующего состояния или заболевания, или профилактическое лечение для предотвращения возникновения состояния или заболевания, или являющегося животным субъекта в медицинских, ветеринарных целях, или в целях разработки. Подходящие животные-субъекты включают млекопитающих, в том числе, но без ограничения ими, приматов, например людей, обезьян, обезьян и т.п.; крупный рогатый скот, например крупный рогатый скот, быков и т.п.; баранов, например овцу и т.п.; козлиных, например, коз и т.п.; свиней, например свиней, свиней и т.п.; лошадиных, например лошадей, ослов, зебр и т.п.; кошачьих, включая диких и домашних кошек; псовых, в том числе собак; лагоморфов, в том числе кроликов, зайцев и т.п.; и грызунов, в том числе мышей, крыс и т.п. Животное может быть трансгенным животным. В некоторых вариантах осуществления

субъектом является человек, включая, но без ограничения этим, эмбриональных, неонатальных субъектов, субъектов в виде младенцев, ювенильных и взрослых субъектов. Кроме того, «субъект» может включать пациента, страдающего или подозреваемого на поражение состоянием или заболеванием.

Термин «терапевтический эффект» относится к местному или системному эффекту у животных, в частности млекопитающих, а конкретнее людей, вызванному фармакологически активным веществом.

Используемые здесь термины «терапевтически эффективное количество» и «эффективное количество» означают такое количество композиции настоящего изобретения, которое эффективно для достижения некоторого желаемого терапевтического эффекта, по меньшей мере, в субпопуляции клеток у животного при приемлемом соотношении польза/риск, применимом к любому медицинскому лечению.

### III. ОБЩИЕ ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Хотя здесь используются специфические термины, они используются только в общем и описательном смысле, а не в целях ограничения. Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые здесь, имеют то же значение, в котором они обычно понимаются специалистом со средним уровнем компетентности в области техники, к которой относится этот описываемый сейчас предмет изобретения.

В соответствии с давней конвенцией о патентном праве термины «a», «an» и «the» относятся к «одному или более» при использовании в данной заявке, включая формулу изобретения. Таким образом, например, ссылка на «субъект» включает множество субъектов, если из контекста явно не следует иное (например, множество субъектов) и т.д.

На всем протяжении этого описания и в формуле изобретения термины «содержать», «содержит» и «содержащий» используются в неисключительном смысле, за исключением случаев, когда контекст требует иного. Аналогично, термин «включать» и его грамматические варианты предназначен не для ограничения, так что перечисление элементов в списке не исключает других подобных

элементов, которые могут быть заменены или добавлены к перечисленным элементам.

Для целей этого описания и прилагаемой формулы изобретения, если не указано иное, все числа, выражающие количества, размеры, размеры, пропорции, формы, составы, параметры, проценты, параметры, количества, характеристики и другие числовые значения, используемые в описании и формуле изобретения, должны пониматься как изменяемые во всех случаях термином «приблизительно», даже несмотря на то, что термин «приблизительно» может прямо не указываться вместе со значением, количеством или диапазоном. Соответственно, если не указано иное, числовые параметры, представленные в нижеследующем описании и прилагаемой формуле изобретения, не являются и не должны быть точными, но могут быть приблизительными и/или больше или меньше по желанию, отражая допуски, коэффициенты пересчета, округление, погрешность измерения и т.п., а также другие факторы, известные специалистам в данной области техники, в зависимости от желаемых свойств, которые должны быть достигнуты согласно раскрываемому сейчас предмету изобретения. Например, термин «приблизительно», когда он относится к значению, как подразумевается, может охватывать вариации, в некоторых вариантах осуществления,  $\pm 100\%$ , в некоторых вариантах осуществления  $\pm 50\%$ , в некоторых вариантах осуществления  $\pm 20\%$ , в некоторых вариантах осуществления  $\pm 10\%$ , в некоторых вариантах осуществления  $\pm 5\%$ , в некоторых вариантах осуществления  $\pm 1\%$ , в некоторых вариантах осуществления  $\pm 0,5\%$  и в некоторых вариантах осуществления  $\pm 0,1\%$  от указанного количества, поскольку такие вариации являются подходящими для выполнения раскрываемых способов или использования раскрываемых композиций.

Кроме того, термин «приблизительно» при использовании в связи с одним или несколькими числами или числовыми диапазонами следует понимать как относящийся ко всем таким числам, включая все числа в диапазоне, и изменяет этот диапазон путем расширения границ выше и ниже указанных числовых значений. Приведение числовых диапазонов с помощью конечных точек включает все числа,

например целые числа, включая их дроби, относящиеся к этому диапазону (например, перечисление от 1 до 5 включает 1, 2, 3, 4 и 5, а также дроби, например, 1,5, 2,25, 3,75, 4,1 и т.п.) и любой диапазон внутри этого диапазона.

#### **ПОЯСНЕНИЯ ПРИМЕРАМИ**

Следующие примеры были включены с целью предоставления руководства специалисту со средним уровнем компетентности в данной области техники для практического осуществления репрезентативных вариантов осуществления раскрываемого сейчас предмета изобретения. В свете настоящего раскрытия и общего уровня компетентности в данной области техники специалисты в данной области техники смогут понять, что следующие примеры предназначены только для примера, и что многочисленные изменения, модификации и изменения могут использоваться, не выходя за пределы объема раскрываемого сейчас предмета изобретения. Описания синтезов и конкретные примеры, которые следуют ниже, предназначены только для целей иллюстрации и не должны рассматриваться как ограничивающие каким-либо образом получение соединений настоящего изобретения другими способами.

#### Способы

Линию клеток почки эмбриона человека (НЕК) 293Т (Life Technologies, Grand Island, NY) поддерживали при 37°C с 5% CO<sub>2</sub>/20% O<sub>2</sub> в модифицированной Дульбекко среде Игла (DMEM) (Invitrogen), дополненной 10% фетальной телячьей сыворотки (Gibco, Life Technologies, Grand Island, NY) и 2 мМ GlutaMAX (Invitrogen).

gRNA, нацеленные на родопсин (смотрите Ranganathan, V and Zack, DJ. grID: A CRISPR guide RNA Database and Resource for Gene-Editing. Submitted (2015)), получали путем перекрывания олигонуклеотидов, которые были подвергнуты отжигу и амплификации с помощью ПЦР с использованием ДНК-полимеразы для двухступенчатой амплификации Phusion Flash (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL), а затем очищали с использованием колонок-очистителей и концентраторов ДНК Zymo. Очищенные продукты ПЦР затем ресуспендировали в H<sub>2</sub>O и количественно

определяли, используя NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific). Экспрессирующие gRNA конструкции были сконструированы с использованием Gibson Assembly (New England Biolabs, Ipswich, MA) (Gibson *et al. Nature Methods* 6:343–345(2009)) с небольшими модификациями. Общий объем реакции был уменьшен с 20 мкл до 2 мкл. Клоны подтверждали с помощью секвенирования по Сэнгеру.

Клетки HEK293 котрансфицировали с использованием Cas9 (немодифицированных или регулируемых клеточным циклом вариантов) и конструкцией, экспрессирующей gRNA, нацеленную на родопсин. Через 48 часов после трансфекции собирали геномную ДНК, и амплифицировали последовательность, окружающую сайты расщепления в качестве мишеней, в соответствии с праймерами, перечисленными в разделе «Приложение». Продукты ПЦР затем очищали и количественно определяли перед проведением анализа с использованием Endo I T7. Вкратце, 200 нг продукта ПЦР подвергали денатурации, а затем медленно повторно отжигали для допуска образования гетеродуплексов, к продуктам ПЦР добавляли эндонуклеазу I T7, и осуществляли инкубацию при 37°C в течение 25 минут для расщепления гетеродуплексов, реакцию гасили при введении красителя, и, наконец, реакцию подвергали электрофорезу в 6%-ном геле TBE-ПААГ для разделения продуктов. Гель окрашивали SYBR-Gold, визуализировали и количественно определяли с использованием ImageJ. Частоты NHEJ рассчитывали с использованием биномиального уравнения:

$$\% \text{ модификации гена} = 1 - \sqrt{\frac{a+b}{a+b+c}} \times 100;$$

где значения «a» и «b» равны суммарной площади расщепленных фрагментов после вычитания фона, а «c» равен суммарной площади нерасщепленного продукта ПЦР после вычитания фона.

### Пример 1

Будучи еще в зачаточном состоянии, система CRISPR произвела революцию в технологии редактирования генома, преобразовала биологические исследования и открыла новую эру в области генетической медицины. Направленные против последовательностей в геноме человека, системы редактирования на основе CRISPR могут

быть адаптированы к разрушению любого гена или регуляторного элемента или делеции и замене последовательности геномной ДНК с высокой степенью специфичности. И хотя многочисленные исследования по всему миру продемонстрировали, что мутации, вызывающие заболевания, могут быть эффективно сделаны мишенями *in vitro*, разработка основанных на CRISPR терапевтических средств для применения *in vivo* была значительно затруднена из-за ограничений в доставке.

Векторы на основе аденоассоциированного вируса (AAV) являются наиболее часто используемыми вирусными векторами в генной терапии с несколькими привлекательными особенностями: вирус является непатогенным, он инфицирует как делящиеся, так и неделящиеся клетки, экспрессия может сохраняться в течение длительных периодов времени, а также заслуживающей внимания информацией о безопасности, эффективности и общем отсутствии токсичности в клинических испытаниях. Кроме того, комбинации различных серотипов AAV эффективны в нацеливании на определенные типы клеток. В то время как AAV векторы обеспечивают безопасное средство доставки терапевтических компонентов CRISPR, существует одно важное техническое препятствие, ограничивающее их применимость - их размер. Длина генома AAV дикого типа составляет ~4,7 т.о., а рекомбинантные вирусы могут упаковывать до 5,0 т.о. Эта пакующая емкость определяет верхний предел ДНК, который можно использовать для одного вирусного вектора.

Система CRISPR/Cas9 состоит из нуклеазы (Cas9) и РНК-проводника (gRNA), которая служит для направления нуклеазы в конкретную область в геноме. Наиболее часто используемый белок Cas9, который кодируется открытой рамкой считывания размером 4104 п.о., происходит из *S. pyogenes* (SpCas9). Предполагалось, что из-за большого размера SpCas9 доставка обоих компонентов CRISPR, включая промоторы и последовательности-терминаторы, необходимые для экспрессии, ограничивается пакующей емкостью AAV. При наличии стандартных промоторных элементов кассеты для SpCas9 и gRNA значительно превышают пакующую емкость AAV.

В WO 2015/195621 (которая полностью включена сюда

посредством ссылки) было раскрыто решение проблемы пакующей емкости, которое значительно расширяет потенциальный диапазон применений для терапевтических CRISPR. В основе этого нового подхода к доставке CRISPR лежит компактный двунаправленный промотор, который очень активен в клетках человека. Промотор H1 является весьма уникальным генетическим элементом, который распознается РНК-полимеразами Pol II и Pol III. Введенный в AAV вектор, промотор H1 может эффективно экспрессировать как Cas9, так и gRNA. Поскольку длина оптимизированного промотора H1 составляет всего ~230 п.о., использование этой кассеты позволяет упаковывать SpCas9 и множество гибридных gRNA в один рекомбинантный AAV.

Размер полного AAV вектора «все в одном», который включает SpCas9, короткую последовательность поли-А (SPA), два отдельно адаптируемых к конкретным применениям каркасной структуры gRNA и промоторный элемент H1, составляет ~4640 т.о. Это почти размер генома AAV дикого типа и все еще намного ниже максимальной пакующей емкости, составляющей 5,2 т.о. Любой из генов Cas9 может быть включен в эту базовую структуру. Таким образом, эта платформа предоставляет возможность нацеливаться на гораздо больше геномных сайтов и мутаций *in vivo*, чем любая существующая технология (фиг. 1).

Другой жизнеспособный подход к доставке в клинических условиях, отличительной чертой которого является Cas9 из *S. aureus* (SaCas9), заключается в использовании меньших ортологов Cas9, которые могут быть упакованы в AAV векторы. Хотя альтернативные белки Cas9 обладают альтернативной специфичностью нацеливания и, вероятно, будут более ограничивающими, чем белок SpCas9, использование меньшего белка saCas9 в сочетании с системой H1 дает значительные преимущества по сравнению с существующим подходом.

Система CRISPR-Cas9 функционирует, вызывая разрыв в дцДНК, однако, единственная точечная мутация в Cas9 может привести к созданию «никазы», вызывающей разрыв в оцДНК. Хотя использование никазы требует вдвое больше gRNA для создания разрыва в дцДНК,

общепризнанного, что она является более безопасной. Важно отметить, что платформа AAV-H1-CRISPR может вместить SaCas9 и более четырех gRNA и, таким образом, может безопасно создавать разрывы ДНК без мутаций вне мишени. В существующих подходах к доставке нет этой возможности.

Врожденный амавроз Лебера (LCA) состоит из группы дегенераций сетчатки в раннем детском возрасте, которые характеризуются тяжелым нарушением функции сетчатки и серьезным ослаблением зрения или слепотой в течение первых месяцев жизни. LCA, редкое заболевание, является самой распространенной причиной наследственной слепоты, составляющей до 5% всех известных наследственных дегенеративных заболеваний сетчатки. В частности, LCA10, заболевание, для которого не существует одобренной FDA терапии, вызывается интронной мутацией в гене CEP290. Эта мутация A→G приводит к созданию сильного сайта донора сплайсинга *de novo* и включению криптического экзона (экзона X) в мРНК CEP290 и последующей дегенерации фоторецепторных или ганглиозных клеток. Эта мутация особенно привлекательна в качестве терапевтической мишени.

Было успешно продемонстрировано, что прототипные AAV-H1-CRISPR надежно экспрессируют как Cas9, так и gRNA в клетках человека и, таким образом, могут эффективно управлять нацеливанием на гены *in vitro*. С использованием мышинной модели заболевания сетчатки было продемонстрировано, что H1-AAV-CRISPR могут использоваться для точного нацеливания на патогенные мутации *in vivo* при субретинальной доставке (фиг.2).

Основанная на AAV стратегия для лечения лежащей в основе причины LCA10 с помощью CRISPR в настоящее время разрабатывается для клинического использования Editas Medicine. Их подход к решению проблемы пакующей емкости AAV заключается в использовании меньшего ортолога Cas9 из *S. aureus* (SaCas9), который кодируется транскриптом размером ~3,2 т.о. Компактный размер гена SaCas9 позволяет упаковывать его в один AAV вектор вместе с двумя кассетами для gRNA, однако технология на основе AAV авторов настоящего изобретения обеспечивает дополнительное

место, которое можно использовать для дополнительных gRNA.

Что касается безопасности терапий на основе CRISPR, наиболее значимым является, несомненно, мутагенез вне мишени; он может произойти, если Cas9 расщепляет ДНК в непредусмотренном месте. К счастью, этот риск можно почти устранить, если использовать модифицированную форму Cas9 (известную как никаза D10A), которая расщепляет только одну цепь ДНК. Благодаря отдельному взаимодействию с двумя gRNA для образования двух близко расположенных друг против друга ников на противоположных цепях, никаза Cas9 может эффективно создавать разрыв двойной цепи. Однако разрыв вне мишени может быть создан никазой только в том случае, если две gRNA распознают сайты вне мишени, которые встречаются в непосредственной близости и на противоположных цепях в других местах генома, что статистически невероятно (Church G. *Nature* 2015 Dec 3;528(7580):S7) и поэтому не наблюдается; ДНК с никами эффективно подвергается репарации нормальными клеточными белками. По этой причине введение Cas9 (D10A) с четырьмя gRNA (по паре с каждой стороны для удаления целевой мутации) для корректирования мутации в CEP290 будет рассматриваться универсально и однозначно как наиболее безопасный подход - в том числе среди регулирующих органов. (Shen *et al. Nature Methods* 11, 399-402 (2014)). Элемент H1 уникально обеспечивает поле для использования этой возможности.

Однако из-за ограничений по размеру в существующей системе (т.е. Editas: saCas9 с системой, отличной от H1), корректирование мутации в CEP290, которое включает удаление приблизительно 1 т.о. интронной ДНК, не может быть осуществлено с помощью безопасного подхода с использованием никазы. Было идентифицировано четыре gRNA, которые позволили бы авторам настоящего изобретения поставить более безопасное лекарственное средство в клинику:

hs07571799[*Sa*]: GATCTTATTCTACTCCTGTGAAAGGAT **(SEQ ID NO:1)**

hs07571796[*Sa*]: AACGTTGTTCTGAGTAGCTTTCAGGAT **(SEQ ID NO:2)**

hs07571783[*Sa*]: GATCATTCTTGTGGCAGTAAGGAGGAT **(SEQ ID NO:3)**

hs07571778[*Sa*]: TCAAAAGCTACCGGTTACCTGAAGGGT **(SEQ ID NO:4)**

Однако из-за использования промотора U6 Editas ограничила

сайты-мишени сайтами для нацеливания с 5'G (Friedland *et al. Genome Biology* 16:257 (2015)).

Существует сайт для нацеливания spCas9, который перекрывается с мутацией A→G. Используя ранее раскрытую систему H1 и spCas9, мутация в CEP290 может быть непосредственно превращена в мишень без необходимости в создании большой делеции. Также ожидается, что этот способ будет безопаснее, чем существующая система Editas.

#### WT

hs028893108; GAGATATTCACAATTACAACCTGG (SEQ ID NO:5)

#### LCA10

hs028893108\*; GAGATACTCACAATTACAACCTGG (SEQ ID NO:6)

Сокращение количества сайтов в результате требования к инициации в 5'G иллюстрирует полезность использования H1 для экспрессии gRNA по сравнению с U6. Кроме того, общее количество сайтов-мишеней показывает, что spCas9 превосходит численно saCas9, как предсказано путем вычислений (Ranganathan *et al. Nat Commun* 2014 Aug 8;5:4516).

**Таблица 2: Сайты для saCas9 (1 т.о. вверх и 1 т.о. вниз от мутации A→G в CEP290)**

хромо сома	Начало	Конец	ID	це пь	последовательность
chr12	88494109	88494083	hs07571772 [Sa]	-	AGAAATAGATGTAGATTGAGGTA GAAT (SEQ ID NO: 7)
chr12	88494180	88494154	hs07571773 [Sa]	-	ATAAGGAAATACAAAAACTGGAT GGGT (SEQ ID NO: 8)
chr12	88494184	88494158	hs07571774 [Sa]	-	GATAATAAGGAAATACAAAAACT GGAT (SEQ ID NO: 9)
chr12	88494212	88494186	hs07571775 [Sa]	-	TCAGATTTTCATGTGTGAAGAATG GAAT (SEQ ID NO:10)
chr12	88494217	88494191	hs07571776 [Sa]	-	GAAATCAGATTTTCATGTGTGAA GAAT (SEQ ID NO:11)
chr12	88494774	88494800	hs07571777 [Sa]	+	CTTTTGACAGTTTTTAAGGCGGG GAGT (SEQ ID NO:12)
chr12	88494780	88494754	hs07571778 [Sa]	-	TCAAAAGCTACCGGTTACCTGAA GGGT (SEQ ID NO:13)
chr12	88494785	88494811	hs07571779 [Sa]	+	TTTTAAGGCGGGGAGTCACATGG GAGT (SEQ ID NO:14)

chr12	88494793	88494819	hs07571780 [Sa]	+	CGGGGAGTCACATGGGAGTCACAGGGT (SEQ ID NO:15)
chr12	88494798	88494824	hs07571781 [Sa]	+	AGTCACATGGGAGTCACAGGGTAGGAT (SEQ ID NO:16)
chr12	88494811	88494837	hs07571782 [Sa]	+	TCACAGGGTAGGATTCATGTTTGAAT (SEQ ID NO:17)
chr12	88494838	88494864	hs07571783 [Sa]	+	GATCATTCTTGTGGCAGTAAGGAGGAT (SEQ ID NO:18)
chr12	88494849	88494823	hs07571784 [Sa]	-	ACAAGAATGATCATTCTAAACATGAAT (SEQ ID NO:19)
chr12	88494864	88494890	hs07571785 [Sa]	+	TGTAAGACTGGAGATAGAGACAGGAAT (SEQ ID NO:20)
chr12	88494868	88494842	hs07571786 [Sa]	-	TTACATCCTCCTTACTGCCACAAAGAT (SEQ ID NO:21)
chr12	88494921	88494947	hs07571787 [Sa]	+	TAAAATAAGACACTGCCAATAGGGAT (SEQ ID NO:22)
chr12	88495501	88495475	hs07571788 [Sa]	-	TTTAACGTTATCATTTTCCCAAAGAGT (SEQ ID NO:23)
chr12	88495532	88495506	hs07571789 [Sa]	-	CATCTTGTGGATAATGTATCAATGAGT (SEQ ID NO:24)
chr12	88495541	88495567	hs07571790 [Sa]	+	CTAGGACTTCTAATGCTGGAGAGGAT (SEQ ID NO:25)
chr12	88495547	88495521	hs07571791 [Sa]	-	GTCCTAGGCAAGAGACATCTTGTGGAT (SEQ ID NO:26)
chr12	88495562	88495588	hs07571792 [Sa]	+	GAGGATAGGACAGAGGACATGGAGAAT (SEQ ID NO:27)
chr12	88495714	88495740	hs07571793 [Sa]	+	AAACATGACTCATAATTTAGTAGGAAT (SEQ ID NO:28)
chr12	88495747	88495721	hs07571794 [Sa]	-	TTTCAGGATTCCCTACTAAATTATGAGT (SEQ ID NO:29)
chr12	88495753	88495779	hs07571795 [Sa]	+	TCAGAACAACGTTTTTCATTTACTGAAT (SEQ ID NO:30)
chr12	88495765	88495739	hs07571796 [Sa]	-	AACGTTGTTCTGAGTAGCTTTCCAGGAT (SEQ ID NO:31)
chr12	88495777	88495751	hs07571797 [Sa]	-	TCAGTAAATGAAAACGTTGTTCTGAGT (SEQ ID NO:32)
chr12	88495794	88495820	hs07571798 [Sa]	+	CAGCAAAAGCTTTTGAGCTAATAGAAT (SEQ ID NO:33)
chr12	88495823	88495849	hs07571799 [Sa]	+	GATCTTATTCTACTCCTGTGAAAGGAT (SEQ ID NO:34)
chr12	88495836	88495862	hs07571800 [Sa]	+	TCCTGTGAAAGGATCTTAGATAAGAAT (SEQ ID NO:35)

chr12	88495855	88495829	hs07571801 [Sa]	-	TCTAAGATCCTTTTCACAGGAGTAAAT (SEQ ID NO:36)
chr12	88495860	88495834	hs07571802 [Sa]	-	TCTTATCTAAGATCCTTTTCACAGGAGT (SEQ ID NO:37)
chr12	88495890	88495864	hs07571803 [Sa]	-	AGAAATAGAGGCTTATGGATTTTGGAT (SEQ ID NO:38)
chr12	88495897	88495871	hs07571804 [Sa]	-	CCTCATCAGAAATAGAGGCTTATGGAT (SEQ ID NO:39)
chr12	88495921	88495947	hs07571805 [Sa]	+	TTCTGTCTCAGTAAAAGGTATAGAGT (SEQ ID NO:40)

**Таблица 3: Сайты для *spCas9* (1 т.о. вверх и 1 т.о. вниз от мутации A→G в CEP290)**

хромосома	Начало	Конец	ID	цепь	последовательность
chr12	88494095	88494073	hs0288930 72	-	ATTGAGGTAGAATCAAGAAGAGG (SEQ ID NO:41)
chr12	88494111	8494089	hs0288930 73	-	AAAGAAATAGATGTAGATTGAGG (SEQ ID NO:42)
chr12	88494177	88494155	hs0288930 74	-	AGGAAATACAAAACTGGATGGG (SEQ ID NO:43)
chr12	88494178	88494156	hs0288930 75	-	AAGGAAATACAAAACTGGATGG (SEQ ID NO:44)
chr12	88494182	88494160	hs0288930 76	-	TAATAAGGAAATACAAAACTGG (SEQ ID NO:45)
chr12	88494197	88494175	hs0288930 77	-	GAAGAATGGAATAGATAATAAGG (SEQ ID NO:46)
chr12	88494211	88494189	hs0288930 78	-	CAGATTTTCATGTGTGAAGAATGG (SEQ ID NO:47)
chr12	88494244	88494222	hs0288930 79	-	GTAAAGGTTTCATGAGACTAGAGG (SEQ ID NO:48)
chr12	88494260	88494238	hs0288930 80	-	TGTTGCTTTTTGAGAGGTAAAGG (SEQ ID NO:49)
chr12	88494266	88494244	hs0288930 81	-	AATTATTGTTGCTTTTTGAGAGG (SEQ ID NO:50)
chr12	88494280	88494302	hs0288930 82	+	ATTTGACACCACATGCACTGTGG (SEQ ID NO:51)
chr12	88494290	88494268	hs0288930 83	-	TGGTGTCAAATATGGTGCTTAGG (SEQ ID NO:52)
chr12	88494298	88494276	hs0288930 84	-	AGTGCATGTGGTGTCAAATATGG (SEQ ID NO:53)
chr12	88494310	88494288	hs0288930	-	GTGGAGAGCCACAGTGCATGTGG (SEQ ID NO:54)

			85		EQ ID NO:54)
chr12	88494770	88494792	hs0288930 86	+	GTAGCTTTTGACAGTTTTTTAAGG(S EQ ID NO:55)
chr12	88494773	88494795	hs0288930 87	+	GCTTTTGACAGTTTTTTAAGGCGG(S EQ ID NO:56)
chr12	88494774	88494796	hs0288930 88	+	CTTTTGACAGTTTTTTAAGGCGGG(S EQ ID NO:57)
chr12	88494775	88494797	hs0288930 89	+	TTTTGACAGTTTTTTAAGGCGGGG(S EQ ID NO:58)
chr12	88494777	88494755	hs0288930 90	-	AAAGCTACCGGTTACCTGAAGGG(S EQ ID NO:59)
chr12	88494778	88494756	hs0288930 91	-	AAAAGCTACCGGTTACCTGAAGG(S EQ ID NO:60)
chr12	88494785	88494807	hs0288930 92	+	TTTTAAGGCGGGGAGTCACATGG(S EQ ID NO:61)
chr12	88494786	88494808	hs0288930 93	+	TTTAAGGCGGGGAGTCACATGGG(S EQ ID NO:62)
chr12	88494789	88494767	hs0288930 94	-	TAAAAACTGTCAAAAGCTACCGG(S EQ ID NO:63)
chr12	88494795	88494817	hs0288930 95	+	GGGAGTCACATGGGAGTCACAGG(S EQ ID NO:64)
chr12	88494796	88494818	hs0288930 96	+	GGAGTCACATGGGAGTCACAGGG(S EQ ID NO:65)
chr12	88494800	88494822	hs0288930 97	+	TCACATGGGAGTCACAGGGTAGG(S EQ ID NO:66)
chr12	88494829	88494851	hs0288930 98	+	GTTTAGAATGATCATTCTTGTGG(S EQ ID NO:67)
chr12	88494837	88494859	hs0288930 99	+	TGATCATTCTTGTGGCAGTAAGG(S EQ ID NO:68)
chr12	88494840	88494862	hs0288931 00	+	TCATTCTTGTGGCAGTAAGGAGG(S EQ ID NO:69)
chr12	88494852	88494874	hs0288931 01	+	CAGTAAGGAGGATGTAAGACTGG(S EQ ID NO:70)
chr12	88494865	88494887	hs0288931 02	+	GTAAGACTGGAGATAGAGACAGG(S EQ ID NO:71)
chr12	88494873	88494895	hs0288931 03	+	GGAGATAGAGACAGGAATAATGG(S EQ ID NO:72)
chr12	88494921	88494899	hs0288931 04	-	ATTTTTTATATATCTTTATTGTGG(S EQ ID NO:73)
chr12	88494922	88494944	hs0288931 05	+	AAAATAAGACACTGCCAATAGG(S EQ ID NO:74)
chr12	88494923	88494945	hs0288931	+	AAACTAAGACACTGCCAATAGGG(S

			06		EQ ID NO:75)
chr12	88494928	88494950	hs0288931 07	+	AAGACACTGCCAATAGGGATAGG(S EQ ID NO:76)
chr12	88494954	88494976	hs0288931 08	+	GAGATATTCACAATTACAACCTGG(S EQ ID NO:77)
chr12	88494959	88494937	hs0288931 09	-	TATCTCATACCTATCCCTATTGG(S EQ ID NO:78)
chr12	88495461	88495483	hs0288931 10	+	GAAAGATGAAAAATACTCTTTGG(S EQ ID NO:79)
chr12	88495462	88495484	hs0288931 11	+	AAAAGATGAAAAATACTCTTTGGG(S EQ ID NO:80)
chr12	88495523	88495545	hs0288931 12	+	CCACAAGATGTCTCTTGCCTAGG(S EQ ID NO:81)
chr12	88495538	88495560	hs0288931 13	+	TGCCTAGGACTTTCTAATGCTGG(S EQ ID NO:82)
chr12	88495543	88495565	hs0288931 14	+	AGGACTTTCTAATGCTGGAGAGG(S EQ ID NO:83)
chr12	88495545	88495523	hs0288931 15	-	CCTAGGCAAGAGACATCTTGTGG(S EQ ID NO:84)
chr12	88495548	88495570	hs0288931 16	+	TTTCTAATGCTGGAGAGGATAGG(S EQ ID NO:85)
chr12	88495555	88495577	hs0288931 17	+	TGCTGGAGAGGATAGGACAGAGG(S EQ ID NO:86)
chr12	88495561	88495583	hs0288931 18	+	AGAGGATAGGACAGAGGACATGG(S EQ ID NO:87)
chr12	88495562	88495540	hs0288931 19	-	CTCCAGCATTAGAAAGTCCTAGG(S EQ ID NO:88)
chr12	88495568	88495590	hs0288931 20	+	AGGACAGAGGACATGGAGAATGG(S EQ ID NO:89)
chr12	88495599	88495621	hs0288931 21	+	AAATTATCACCACACTAAATAGG(S EQ ID NO:90)
chr12	88495630	88495608	hs0288931 22	-	AAAATTATGCCTATTTAGTGTGG(S EQ ID NO:91)
chr12	88495640	88495662	hs0288931 23	+	GTAACATAATCACCTCTCTTTGG(S EQ ID NO:92)
chr12	88495674	88495652	hs0288931 24	-	CTGCTGCTTTTGCCAAAGAGAGG(S EQ ID NO:93)
chr12	88495715	88495737	hs0288931 25	+	AACATGACTCATAATTTAGTAGG(S EQ ID NO:94)
chr12	88495763	88495741	hs0288931 26	-	CGTTGTTCTGAGTAGCTTTTCAGG(S EQ ID NO:95)
chr12	88495815	88495793	hs0288931	-	ATTAGCTCAAAGCTTTTGCTGG(S

			27		EQ ID NO:96)
chr12	88495825	88495847	hs0288931 28	+	TCTTATTCTACTCCTGTGAAAGG(S EQ ID NO:97)
chr12	88495859	88495837	hs0288931 29	-	CTTATCTAAGATCCTTTTCACAGG(S EQ ID NO:98)
chr12	88495875	88495897	hs0288931 30	+	ATAAGCCTCTATTTCTGATGAGG(S EQ ID NO:99)
chr12	88495888	88495866	hs0288931 31	-	AAATAGAGGCTTATGGATTTTGG(S EQ ID NO:100)
chr12	88495892	88495914	hs0288931 32	+	ATGAGGAAGATGAACAAATCAGG(S EQ ID NO:101)
chr12	88495895	88495873	hs0288931 33	-	TCATCAGAAATAGAGGCTTATGG(S EQ ID NO:102)
chr12	88495902	88495880	hs0288931 34	-	ATCTTCCTCATCAGAAATAGAGG(S EQ ID NO:103)
chr12	88495917	88495939	hs0288931 35	+	CTTGTTCTGTCCTCAGTAAAAGG(S EQ ID NO:104)
chr12	88495933	88495955	hs0288931 36	+	TAAAAGGTATAGAGTTCAAGTGG(S EQ ID NO:105)
chr12	88495949	88495927	hs0288931 37	-	GAACCTATACCTTTTACTGAGG(S EQ ID NO:106)
chr12	88495953	88495975	hs0288931 38	+	TGGCTGTAAGATAACTACAAAGG(S EQ ID NO:107)
chr12	88495954	88495976	hs0288931 39	+	GGCTGTAAGATAACTACAAAGGG(S EQ ID NO:108)
chr12	88495959	88495981	hs0288931 40	+	TAAGATAACTACAAAGGGTCTGG(S EQ ID NO:109)

Таблица 4: Интронные мишени в SER290

## SpCas9

ID	последовательность
hs028892997	ACAATGTCATTTTGTGGTATTGG (SEQ ID NO: 164)
hs028892998	GTTAAGACAATGTCATTTTGTGG (SEQ ID NO: 165)
hs028892999	AAACTGGATTGTGAGTTTTAAGG (SEQ ID NO: 166)
hs028893000	ATTCTAATTTTGTAAAAACTGG (SEQ ID NO: 167)
hs028893001	ATCCTGTGTTATCCAATATACGG (SEQ ID NO: 168)
hs028893002	ATATTGGATAACACAGGATTTGG (SEQ ID NO: 169)
hs028893003	GGCCGTATATTGGATAACACAGG (SEQ ID NO: 170)
hs028893004	CAGAAATTGAGGCCGTATATTGG (SEQ ID NO: 171)
hs028893005	AAGCTAATACTCAGAAATTGAGG (SEQ ID NO: 172)
hs028893006	CTAAAGCTGTACATTCATTTTGG (SEQ ID NO: 173)
hs028893007	AAATGAATGTACAGCTTTAGTGG (SEQ ID NO: 174)

hs028893008	CTTGAGTATTCTAAGAGTTTTGG (SEQ ID NO: 175)
hs028893009	AAGTAAGCACTAGTTTGTGAAGG (SEQ ID NO: 176)
hs028893010	CTCAGCAACTGTGTGCATGAAGG (SEQ ID NO: 177)
hs028893011	TCTGTCACTGATGGCACACTAGG (SEQ ID NO: 178)
hs028893012	ACATCATCATCTGTCACTGATGG (SEQ ID NO: 179)
hs028893013	TGAAAAGAAATATAAAATTCTGG (SEQ ID NO: 180)
hs028893017	CTGAATGGGCAGAACTCTGAAGG (SEQ ID NO: 181)
hs028893014	ATTCAGTGCCTATGTGTGTGTGG (SEQ ID NO: 182)
hs028893015	TTCAGTGCCTATGTGTGTGTGGG (SEQ ID NO: 183)
hs028893016	AGTGCCTATGTGTGTGTGGGTGG (SEQ ID NO: 184)
hs028893018	GTGCCTATGTGTGTGTGGGTGGG (SEQ ID NO: 185)
hs028893019	CCTATGTGTGTGTGGGTGGGTGG (SEQ ID NO: 186)
hs028893021	CACACACATAGGCACTGAATGGG (SEQ ID NO: 187)
hs028893022	ACACACACATAGGCACTGAATGG (SEQ ID NO: 188)
hs028893020	TGTGTGTGTGGGTGGGTGGCAGG (SEQ ID NO: 189)
hs028893024	CCACCCACCCACACACACATAGG (SEQ ID NO: 190)
hs028893023	GGCAGGATTCGCCAGAGTGTGG (SEQ ID NO: 191)
hs028893025	GGATTCGCCAGAGTGTGGAAGG (SEQ ID NO: 192)
hs028893026	ATCTGCTGCCTTCCACACTCTGG (SEQ ID NO: 193)
hs028893027	TGAGCCAGTGAATAATAGAAAGG (SEQ ID NO: 194)
hs028893030	TGTTCCTTTTCTATTATTCCTGG (SEQ ID NO: 195)
hs028893028	AAAGGAACATTTAGATAGAGCGG (SEQ ID NO: 196)
hs028893029	CATTTAGATAGAGCGGTTGAAGG (SEQ ID NO: 197)
hs028893032	CTTAAATATCAATTATTTGGTGG (SEQ ID NO: 198)
hs028893031	GATATTTAAGCTGAACTGTGAGG (SEQ ID NO: 199)
hs028893033	CAGCTTAAATATCAATTATTTGG (SEQ ID NO: 200)
hs028893034	AGTAAACCCAGATGCTCCAAAGG (SEQ ID NO: 201)
hs028893035	CTCCAAAGGAAGAAAGCATTTGG (SEQ ID NO: 202)
hs028893036	TTTCTTCCTTTGGAGCATCTGGG (SEQ ID NO: 203)
hs028893037	CTTCTTCCTTTGGAGCATCTGG (SEQ ID NO: 204)
hs028893039	TTCCAAATGCTTTCTTCCTTTGG (SEQ ID NO: 205)
hs028893038	GGAATACTATAAGATCTGAGAGG (SEQ ID NO: 206)
hs028893040	GAAAAAATGATTGAAATGATTGG (SEQ ID NO: 207)
hs028893041	ATGATTGAAATGATTGGAGCAGG (SEQ ID NO: 208)
hs028893042	GATTGGAGCAGGAAATGATTTGG (SEQ ID NO: 209)
hs028893043	TGGAGCAGGAAATGATTTGGAGG (SEQ ID NO: 210)
hs028893044	CAGGAAATGATTTGGAGGACTGG (SEQ ID NO: 211)
hs028893045	TTTATATACTATGAATACACAGG (SEQ ID NO: 212)
hs028893046	ATATACTATGAATACACAGGAGG (SEQ ID NO: 213)
hs028893047	TATACTATGAATACACAGGAGGG (SEQ ID NO: 214)
hs028893048	GAATACACAGGAGGGAAAACAGG (SEQ ID NO: 215)

hs028893049	TACACAGGAGGGAAAACAGGAGG (SEQ ID NO: 216)
hs028893050	GGAGGGAAAACAGGAGGCTGAGG (SEQ ID NO: 217)
hs028893051	GAGGGAAAACAGGAGGCTGAGGG (SEQ ID NO: 218)
hs028893052	TTCCTTTTCATCCTTTTTTCACAGG (SEQ ID NO: 219)
hs028893053	GGATGAAAGGAAGAAAAAATGG (SEQ ID NO: 220)
hs028893054	ATCCTGTGAAAAGGATGAAAGG (SEQ ID NO: 221)
hs028893055	ATAGGATTATCCTGTGAAAAGG (SEQ ID NO: 222)
hs028893056	AGAGATTTGTAACAAACAATAGG (SEQ ID NO: 223)
hs028893057	AGCAAAATATCAGGGTAGGTGGG (SEQ ID NO: 224)
hs028893058	TAGCAAAATATCAGGGTAGGTGG (SEQ ID NO: 225)
hs028893059	AAATAGCAAAATATCAGGGTAGG (SEQ ID NO: 226)
hs028893060	AGGGAAATAGCAAAATATCAGGG (SEQ ID NO: 227)
hs028893061	AAGGGAAATAGCAAAATATCAGG (SEQ ID NO: 228)
hs028893062	AGAGATGAAAGTGGTAATAAGGG (SEQ ID NO: 229)
hs028893063	AAGAGATGAAAGTGGTAATAAGG (SEQ ID NO: 230)
hs028893064	ATGAAGATAAGAGATGAAAGTGG (SEQ ID NO: 231)
hs028893065	AAGAAAATTTAGAGTTACTAGGG (SEQ ID NO: 232)
hs028893066	AAAGAAAATTTAGAGTTACTAGG (SEQ ID NO: 233)
hs028893067	CCCTCCTCCTGAAACTTCACTGG (SEQ ID NO: 234)
hs028893068	CCAGTGAAGTTTCAGGAGGAGGG (SEQ ID NO: 235)
hs028893069	ACCAGTGAAGTTTCAGGAGGAGG (SEQ ID NO: 236)
hs028893070	GAGACCAGTGAAGTTTCAGGAGG (SEQ ID NO: 237)
hs028893071	AAGGAGACCAGTGAAGTTTCAGG (SEQ ID NO: 238)
hs028893072	ATTGAGGTAGAATCAAGAAGAGG (SEQ ID NO: 239)
hs028893073	AAAGAAATAGATGTAGATTGAGG (SEQ ID NO: 240)
hs028893074	AGGAAATACAAAACTGGATGGG (SEQ ID NO: 241)
hs028893075	AAGGAAATACAAAACTGGATGG (SEQ ID NO: 242)
hs028893076	TAATAAGGAAATACAAAACTGG (SEQ ID NO: 243)
hs028893077	GAAGAATGGAATAGATAATAAGG (SEQ ID NO: 244)
hs028893078	CAGATTTTCATGTGTGAAGAATGG (SEQ ID NO: 245)
hs028893079	GTAAAGTTTCATGAGACTAGAGG (SEQ ID NO: 246)
hs028893080	TGTTGCTTTTTGAGAGGTAAAGG (SEQ ID NO: 247)
hs028893081	AATTATTGTTGCTTTTTGAGAGG (SEQ ID NO: 248)
hs028893082	ATTTGACACCACATGCACTGTGG (SEQ ID NO: 249)
hs028893083	TGGTGTCAAATATGGTGCTTAGG (SEQ ID NO: 250)
hs028893084	AGTGCATGTGGTGTCAAATATGG (SEQ ID NO: 251)
hs028893085	GTGGAGAGCCACAGTGCATGTGG (SEQ ID NO: 252)
hs028893090	AAAGCTACCGTTACCTGAAGGG (SEQ ID NO: 253)
hs028893091	AAAAGCTACCGTTACCTGAAGG (SEQ ID NO: 254)
hs028893086	GTAGCTTTTGACAGTTTTTAAGG (SEQ ID NO: 255)
hs028893087	GCTTTTGACAGTTTTTAAGGCGG (SEQ ID NO: 256)

hs028893088	CTTTTGACAGTTTTTAAGGCGGG (SEQ ID NO: 257)
hs028893089	TTTTGACAGTTTTTAAGGCGGG (SEQ ID NO: 258)
hs028893094	TAAAACTGTCAAAGCTACCGG (SEQ ID NO: 259)
hs028893092	TTTTAAGGCGGGGAGTCACATGG (SEQ ID NO: 260)
hs028893093	TTTAAGGCGGGGAGTCACATGGG (SEQ ID NO: 261)
hs028893095	GGGAGTCACATGGGAGTCACAGG (SEQ ID NO: 262)
hs028893096	GGAGTCACATGGGAGTCACAGGG (SEQ ID NO: 263)
hs028893097	TCACATGGGAGTCACAGGGTAGG (SEQ ID NO: 264)
hs028893098	GTTTAGAATGATCATTCCTGTGG (SEQ ID NO: 265)
hs028893099	TGATCATTCCTGTGGCAGTAAGG (SEQ ID NO: 266)
hs028893100	TCATTCTTGTGGCAGTAAGGAGG (SEQ ID NO: 267)
hs028893101	CAGTAAGGAGGATGTAAGACTGG (SEQ ID NO: 268)
hs028893102	GTAAGACTGGAGATAGAGACAGG (SEQ ID NO: 269)
hs028893103	GGAGATAGAGACAGGAATAATGG (SEQ ID NO: 270)
hs028893104	ATTTTTTATTATCTTTATTGTGG (SEQ ID NO: 271)
hs028893105	AAACTAAGACACTGCCAATAGG (SEQ ID NO: 272)
hs028893106	AAACTAAGACACTGCCAATAGGG (SEQ ID NO: 273)
hs028893107	AAGACACTGCCAATAGGGATAGG (SEQ ID NO: 274)
hs028893109	TATCTCATACCTATCCCTATTGG (SEQ ID NO: 275)
hs028893108	GAGATATTCACAATTACAACCTGG (SEQ ID NO: 276)
hs028893110	GAAAGATGAAAATACTCTTTGG (SEQ ID NO: 277)
hs028893111	AAAGATGAAAATACTCTTTGGG (SEQ ID NO: 278)
hs028893112	CCACAAGATGTCTCTTGCCTAGG (SEQ ID NO: 279)
hs028893115	CCTAGGCAAGAGACATCTTGTGG (SEQ ID NO: 280)
hs028893113	TGCCTAGGACTTTCTAATGCTGG (SEQ ID NO: 281)
hs028893114	AGGACTTTCTAATGCTGGAGAGG (SEQ ID NO: 282)
hs028893116	TTTCTAATGCTGGAGAGGATAGG (SEQ ID NO: 283)
hs028893119	CTCCAGCATTAGAAAGTCCTAGG (SEQ ID NO: 284)
hs028893117	TGCTGGAGAGGATAGGACAGAGG (SEQ ID NO: 285)
hs028893118	AGAGGATAGGACAGAGGACATGG (SEQ ID NO: 286)
hs028893120	AGGACAGAGGACATGGAGAATGG (SEQ ID NO: 287)
hs028893121	AAATTATCACCACACTAAATAGG (SEQ ID NO: 288)
hs028893122	AAAATTATGCCTATTTAGTGTGG (SEQ ID NO: 289)
hs028893123	GTAACATAATCACCTCTCTTTGG (SEQ ID NO: 290)
hs028893124	CTGCTGCTTTTGCCAAAGAGAGG (SEQ ID NO: 291)
hs028893125	AACATGACTCATAATTTAGTAGG (SEQ ID NO: 292)
hs028893126	CGTTGTTCTGAGTAGCTTTCAGG (SEQ ID NO: 293)
hs028893127	ATTAGCTCAAAGCTTTTGCTGG (SEQ ID NO: 294)
hs028893128	TCTTATTCTACTCCTGTGAAAGG (SEQ ID NO: 295)
hs028893129	CTTATCTAAGATCCTTTCACAGG (SEQ ID NO: 296)
hs028893130	ATAAGCCTCTATTTCTGATGAGG (SEQ ID NO: 297)

hs028893131	AAATAGAGGCTTATGGATTTTGG (SEQ ID NO: 298)
hs028893133	TCATCAGAAATAGAGGCTTATGG (SEQ ID NO: 299)
hs028893132	ATGAGGAAGATGAACAAATCAGG (SEQ ID NO: 300)
hs028893134	ATCTTCCTCATCAGAAATAGAGG (SEQ ID NO: 301)
hs028893135	CTTGTTCTGTCCCTCAGTAAAAGG (SEQ ID NO: 302)
hs028893136	TAAAAGGTATAGAGTTCAAGTGG (SEQ ID NO: 303)
hs028893137	GAACTCTATACCTTTTACTGAGG (SEQ ID NO: 304)
hs028893138	TGGCTGTAAGATAACTACAAAGG (SEQ ID NO: 305)
hs028893139	GGCTGTAAGATAACTACAAAGGG (SEQ ID NO: 306)
hs028893140	TAAGATAACTACAAAGGGTCTGG (SEQ ID NO: 307)
hs028893141	TAAGTTACAATCTGTGAATATGG (SEQ ID NO: 308)
hs028893142	GAATTTACAGAGTGCATCCATGG (SEQ ID NO: 309)
hs028893143	ACAGAGTGCATCCATGGTCCAGG (SEQ ID NO: 310)
hs028893145	TAAGGGCTCTTCCTGGACCATGG (SEQ ID NO: 311)
hs028893144	CTTAATATTTTCAGCTACTGTTGG (SEQ ID NO: 312)
hs028893146	GAAATATTAAGGGCTCTTCCTGG (SEQ ID NO: 313)
hs028893148	AACAGTAGCTGAAATATTAAGGG (SEQ ID NO: 314)
hs028893149	CAACAGTAGCTGAAATATTAAGG (SEQ ID NO: 315)
hs028893147	TGTTGGCTACATCCATTCCAAGG (SEQ ID NO: 316)
hs028893150	CATTCCAAGGAACAAAAGCCAGG (SEQ ID NO: 317)
hs028893151	ATTCCAAGGAACAAAAGCCAGGG (SEQ ID NO: 318)
hs028893152	GGAACAAAAGCCAGGGACCATGG (SEQ ID NO: 319)
hs028893153	GAACAAAAGCCAGGGACCATGGG (SEQ ID NO: 320)
hs028893154	CTGGCTTTTGTTCCTTGGAAATGG (SEQ ID NO: 321)
hs028893155	GGTCCCTGGCTTTTGTTCCTTGG (SEQ ID NO: 322)
hs028893156	CATGGGAGAATAGTTTGTTCCTGG (SEQ ID NO: 323)
hs028893157	ATGGGAGAATAGTTTGTTCCTGGG (SEQ ID NO: 324)
hs028893161	AACTATTCTCCCATGGTCCCTGG (SEQ ID NO: 325)
hs028893158	GAATAGTTTGTTCCTGGGTACAGG (SEQ ID NO: 326)
hs028893159	AATAGTTTGTTCCTGGGTACAGGG (SEQ ID NO: 327)
hs028893160	ATAGTTTGTTCCTGGGTACAGGGG (SEQ ID NO: 328)
hs028893163	CAGAACAACTATTCTCCCATGG (SEQ ID NO: 329)
hs028893162	TGGGTACAGGGGTAAGAGAAAGG (SEQ ID NO: 330)
hs028893164	GGGTACAGGGGTAAGAGAAAGGG (SEQ ID NO: 331)
hs028893165	ACAGGGGTAAGAGAAAGGGATGG (SEQ ID NO: 332)
hs028893166	CAGGGGTAAGAGAAAGGGATGGG (SEQ ID NO: 333)
hs028893167	AGAATATTGTAATCAAAGGAGGG (SEQ ID NO: 334)
hs028893168	TAGAATATTGTAATCAAAGGAGG (SEQ ID NO: 335)
hs028893169	AGGTAGAATATTGTAATCAAAGG (SEQ ID NO: 336)
hs028893170	TCCTTTTTCTCTTAGATGTCTGG (SEQ ID NO: 337)
hs028893171	GAGAAAAAGGAGCATGAAACAGG (SEQ ID NO: 38)

hs028893172	CTTAGATGTCTGGTTAAAAGAGG (SEQ ID NO: 339)
hs028893173	ACCAGACATCTAAGAGAAAAAGG (SEQ ID NO: 340)
hs028893174	TAAATCATGCAAGTGACCTAAGG (SEQ ID NO: 341)
hs028893175	TTATCTAGATCATTCTCCTTAGG (SEQ ID NO: 342)
hs028893176	AATATATTATCTATTTATAGTGG (SEQ ID NO: 343)
hs028893177	GTGTGTGTGTGTGTGTATGTGG (SEQ ID NO: 344)
hs028893178	TGTGTGTGTGTGTGTATGTGGG (SEQ ID NO: 345)
hs028893179	ACTAAACTGAATGAATAATATGG (SEQ ID NO: 346)
hs028893180	TGTTAAATTTATATAAATGCAGG (SEQ ID NO: 347)
hs028893182	TTTTTGTGTTTGGGGGATTTGG (SEQ ID NO: 348)
hs028893181	ACAAAAATATTGAAGAAAAATGG (SEQ ID NO: 349)
hs028893183	TCAATATTTTTGTGTTTGGGGG (SEQ ID NO: 350)
hs028893184	TTCAATATTTTTGTGTTTGGGGG (SEQ ID NO: 351)
hs028893185	CTTCAATATTTTTGTGTTTGGGG (SEQ ID NO: 352)
hs028893187	TCTTCAATATTTTTGTGTTTGGG (SEQ ID NO: 353)
hs028893188	TTCTTCAATATTTTTGTGTTTGG (SEQ ID NO: 354)
hs028893186	GAAAAATGGCTAATTTCAAGG (SEQ ID NO: 355)
hs028893189	AATCACACAACTTACCTCCAGG (SEQ ID NO: 356)

**SaCas9**

<u>ID</u>	<u>последовательность</u>
hs07571737 [Sa]	ATGTCATTTTTGTGGTATTGGTCTGAAT (SEQ ID NO: 357)
hs07571738 [Sa]	CAATCCAGTTTTTTACAAAAATAGAAAT (SEQ ID NO: 358)
hs07571739 [Sa]	AATTTTTGTAAAAAACTGGATTGTGAGT (SEQ ID NO: 359)
hs07571740 [Sa]	AAATTCTAATTTTTGTAAAAAACTGGAT (SEQ ID NO: 360)
hs07571741 [Sa]	TCCAATATACGGCCTCAATTTCTGAGT (SEQ ID NO: 361)
hs07571742 [Sa]	GTATATTGGATAACACAGGATTTGGAT (SEQ ID NO: 362)
hs07571743 [Sa]	GAGGCCGTATATTGGATAACACAGGAT (SEQ ID NO: 363)
hs07571744 [Sa]	CTCAGAAATTGAGGCCGTATATTGGAT (SEQ ID NO: 364)
hs07571745 [Sa]	ATTCATTTTGGCCAAAACTCTTAGAAAT (SEQ ID NO: 365)
hs07571746 [Sa]	GCCAAAACTCTTAGAATACTCAAGAGT (SEQ ID NO: 366)
hs07571747 [Sa]	ATTCTAAGAGTTTTTGGCCAAAAATGAAT (SEQ ID NO: 367)
hs07571748 [Sa]	TGCAAACTCTTGAGTATTCTAAGAGT (SEQ ID NO: 368)
hs07571749 [Sa]	TTTGTGAAGGCTGCAAACTCTTGAGT (SEQ ID NO: 369)
hs07571750 [Sa]	CATCTGTCACTGATGGCACACTAGGAT (SEQ ID NO: 370)
hs07571751 [Sa]	GAAATATAAAATTTCTGGCCTTCAGAGT (SEQ ID NO: 371)
hs07571752 [Sa]	CCATTCAAGTGCCTATGTGTGTGGGT (SEQ ID NO: 372)
hs07571753 [Sa]	AATGGGCAGAACTCTGAAGGCCAGAAT (SEQ ID NO: 373)
hs07571754 [Sa]	TCAGTGCCTATGTGTGTGGGTGGGT (SEQ ID NO: 374)
hs07571755 [Sa]	TATGTGTGTGTGGGTGGGTGGCAGGAT (SEQ ID NO: 375)
hs07571756 [Sa]	GGGTGGGTGGCAGGATTTCCGCCAGAGT (SEQ ID NO: 376)
hs07571757 [Sa]	CCACCCACACACACATAGGCACTGAAT (SEQ ID NO: 377)

hs07571758 [Sa]	CATTTAGAAAAGAAAATAAAAAACAGAGT (SEQ ID NO: 378)
hs07571759 [Sa]	TAAAAACAGAGTACTGAGCCAGTGAAT (SEQ ID NO: 379)
hs07571760 [Sa]	AACATTTAGATAGAGCGGTTGAAGGAT (SEQ ID NO: 380)
hs07571761 [Sa]	GCTCCAAAGGAAGAAAGCATTTGGAAT (SEQ ID NO: 381)
hs07571762 [Sa]	TGCTTTCTTCCTTTGGAGCATCTGGGT (SEQ ID NO: 382)
hs07571763 [Sa]	ATAATTATAGTTTTATATACTATGAAT (SEQ ID NO: 382)
hs07571764 [Sa]	CAGGAGGGAAAACAGGAGGCTGAGGGT (SEQ ID NO: 384)
hs07571765 [Sa]	TCTTCCTTTCATCCTTTTTTCACAGGAT (SEQ ID NO: 385)
hs07571766 [Sa]	AAGGATGAAAGGAAGAAAAAATGGAT (SEQ ID NO: 386)
hs07571767 [Sa]	CAATAGGATTATCCTGTGAAAAAGGAT (SEQ ID NO: 387)
hs07571768 [Sa]	AAAGAGATTTGTAACAAACAATAGGAT (SEQ ID NO: 388)
hs07571769 [Sa]	ATAAGGGAAATAGCAAAATATCAGGGT (SEQ ID NO: 389)
hs07571770 [Sa]	AAAATTTAGAGTTACTAGGGAGAGAGT (SEQ ID NO: 390)
hs07571771 [Sa]	CAGGAGGAGGGAAAAGAAAATTTAGAGT (SEQ ID NO: 391)
hs07571772 [Sa]	AGAAATAGATGTAGATTGAGGTAGAAT (SEQ ID NO: 392)
hs07571773 [Sa]	ATAAGGAAATACAAAACTGGATGGGT (SEQ ID NO: 393)
hs07571774 [Sa]	GATAATAAGGAAATACAAAACTGGAT (SEQ ID NO: 394)
hs07571775 [Sa]	TCAGATTTTCATGTGTGAAGAATGGAAT (SEQ ID NO: 395)
hs07571776 [Sa]	GAAAATCAGATTTTCATGTGTGAAGAAT (SEQ ID NO: 396)
hs07571777 [Sa]	CTTTTGACAGTTTTTAAGGCGGGGAGT (SEQ ID NO: 397)
hs07571778 [Sa]	TCAAAAGCTACCGGTTACCTGAAGGGT (SEQ ID NO: 398)
hs07571779 [Sa]	TTTTAAGGCGGGGAGTCACATGGGAGT (SEQ ID NO: 399)
hs07571780 [Sa]	CGGGGAGTCACATGGGAGTCACAGGGT (SEQ ID NO: 400)
hs07571781 [Sa]	AGTCACATGGGAGTCACAGGGTAGGAT (SEQ ID NO: 401)
hs07571782 [Sa]	TCACAGGGTAGGATTCATGTTTAGAAT (SEQ ID NO: 402)
hs07571783 [Sa]	GATCATTCTTGTGGCAGTAAGGAGGAT (SEQ ID NO: 403)
hs07571784 [Sa]	ACAAGAATGATCATTCTAAACATGAAT (SEQ ID NO: 404)
hs07571785 [Sa]	TGTAAGACTGGAGATAGAGACAGGAAT (SEQ ID NO: 405)
hs07571786 [Sa]	TTACATCCTCCTTACTGCCACAAGAAT (SEQ ID NO: 406)
hs07571787 [Sa]	TAAAAC TAAGACTGCCAATAGGGAT (SEQ ID NO: 407)
hs07571788 [Sa]	TTTAACGTTATCATTTTTCCCAAAGAGT (SEQ ID NO: 408)
hs07571789 [Sa]	CATCTTGTGGATAATGTATCAATGAGT (SEQ ID NO: 409)
hs07571790 [Sa]	CTAGGACTTTCTAATGCTGGAGAGGAT (SEQ ID NO: 410)
hs07571791 [Sa]	GTCC TAGGCAAGAGACATCTTGTGGAT (SEQ ID NO: 411)
hs07571792 [Sa]	GAGGATAGGACAGAGGACATGGAGAAT (SEQ ID NO: 412)
hs07571793 [Sa]	AAACATGACTCATAATTTAGTAGGAAT (SEQ ID NO: 413)
hs07571794 [Sa]	TTTCAGGATTCCTACTAAATTATGAGT (SEQ ID NO: 414)
hs07571795 [Sa]	TCAGAACAACGTTTTTCATTTACTGAAT (SEQ ID NO: 415)
hs07571796 [Sa]	AACGTTGTTCTGAGTAGCTTTCAGGAT (SEQ ID NO: 416)
hs07571797 [Sa]	TCAGTAAATGAAAACGTTGTTCTGAGT (SEQ ID NO: 417)
hs07571798 [Sa]	CAGCAAAAGCTTTTTGAGCTAATAGAAT (SEQ ID NO: 418)

hs07571799 [Sa]	GATCTTATTCTACTCCTGTGAAAAGGAT (SEQ ID NO: 419)
hs07571800 [Sa]	TCCTGTGAAAAGGATCTTAGATAAGAAT (SEQ ID NO: 420)
hs07571801 [Sa]	TCTAAGATCCTTTACAGGAGTAGAAT (SEQ ID NO: 421)
hs07571802 [Sa]	TCTTATCTAAGATCCTTTACAGGAGT (SEQ ID NO: 422)
hs07571803 [Sa]	AGAAATAGAGGCTTATGGATTTTGGAT (SEQ ID NO: 423)
hs07571804 [Sa]	CCTCATCAGAAATAGAGGCTTATGGAT (SEQ ID NO: 424)
hs07571805 [Sa]	TTCTGTCCCTCAGTAAAAGGTATAGAGT (SEQ ID NO: 425)
hs07571806 [Sa]	AGTGGCTGTAAGATAACTACAAAGGGT (SEQ ID NO: 426)
hs07571807 [Sa]	GAATATCATAAGTTACAATCTGTGAAT (SEQ ID NO: 427)
hs07571808 [Sa]	TATTCTACAATAAAAAATGATGAGAAT (SEQ ID NO: 428)
hs07571809 [Sa]	ATAAAAAATGATGAGAATTTACAGAGT (SEQ ID NO: 429)
hs07571810 [Sa]	TTTTTTATTGTAGAATAAATGTAGAAT (SEQ ID NO: 430)
hs07571811 [Sa]	AATTCTCATCATTTTTTTATTGTAGAAT (SEQ ID NO: 431)
hs07571812 [Sa]	ATTAAGGGCTCTTCCTGGACCATGGAT (SEQ ID NO: 432)
hs07571813 [Sa]	AACAAAAGCCAGGGACCATGGGAGAAT (SEQ ID NO: 433)
hs07571814 [Sa]	CCCTGGCTTTTTGTTCCCTTGGAAATGGAT (SEQ ID NO: 434)
hs07571815 [Sa]	ACCATGGGAGAATAGTTTGTCTGGGT (SEQ ID NO: 435)
hs07571816 [Sa]	TGGTCCCTGGCTTTTTGTTCCCTTGGAAAT (SEQ ID NO: 436)
hs07571817 [Sa]	AGAATAGTTTGTCTGGGTACAGGGGT (SEQ ID NO: 437)
hs07571818 [Sa]	CTGGGTACAGGGGTAAGAGAAAAGGGAT (SEQ ID NO: 438)
hs07571819 [Sa]	AGAGAAAAGGGATGGGCACTTAATGAGT (SEQ ID NO: 439)
hs07571820 [Sa]	GAAAAAGGAGCATGAAACAGGTAGAAT (SEQ ID NO: 440)
hs07571821 [Sa]	AAATCATGCAAGTGACCTAAGGAGAAT (SEQ ID NO: 441)
hs07571822 [Sa]	TAGGTCACTTGCATGATTTAGCTGAAT (SEQ ID NO: 442)
hs07571823 [Sa]	TTTATAGTGGCTGAATGACTTCTGAAT (SEQ ID NO: 443)
hs07571824 [Sa]	TATATTATCTATTTATAGTGGCTGAAT (SEQ ID NO: 444)
hs07571825 [Sa]	AACAAAATATTTATAACTAACTGAAT (SEQ ID NO: 445)
hs07571826 [Sa]	AAATATTTATAACTAACTGAATGAAT (SEQ ID NO: 446)
hs07571827 [Sa]	TAACTAACTGAATGAATAATATGGAT (SEQ ID NO: 447)
hs07571828 [Sa]	CTTCAATATTTTTGTGTTTGGGGGGAT (SEQ ID NO: 448)
hs07571829 [Sa]	ATGGCTAATTTACAAGGTTCAAGAAT (SEQ ID NO: 449)

**StCas9**

<u>ID</u>	<u>последовательность</u>
hs02772544 [St]	ATCCAGTTTTTTACAAAATTAGAAT (SEQ ID NO: 450)
hs02772545 [St]	AGTGGCAGAAGCTAATACTCAGAAA (SEQ ID NO: 451)
hs02772546 [St]	TCATTTTGGCCAAAACCTTAGAAT (SEQ ID NO: 452)
hs02772547 [St]	TGATGATGTTTACAGTGAAAAGAAA (SEQ ID NO: 453)
hs02772548 [St]	TGGGCAGAACTCTGAAGGCCAGAAT (SEQ ID NO: 454)
hs02772549 [St]	GTA CTGAGCCAGTGAATAATAGAAA (SEQ ID NO: 455)
hs02772550 [St]	AACCCAGATGCTCCAAAGGAAGAAA (SEQ ID NO: 456)
hs02772551 [St]	AAAGGAAGAAAAAATGGATAGAAA (SEQ ID NO: 457)

hs02772552 [St]	TGTGAAAAAGGATGAAAGGAAGAAA (SEQ ID NO: 458)
hs02772553 [St]	AAAATATCAGGGTAGGTGGGAGAAA (SEQ ID NO: 459)
hs02772554 [St]	GAAGTTTCAGGAGGAGGGAAAAGAAA (SEQ ID NO: 460)
hs02772555 [St]	AAATAGATGTAGATTGAGGTAGAAT (SEQ ID NO: 461)
hs02772556 [St]	ATTTGATAGTAGAAGAAAAAAGAAA (SEQ ID NO: 462)
hs02772557 [St]	ACTTGAAATTTGATAGTAGAAGAAA (SEQ ID NO: 463)
hs02772558 [St]	TGGATGGGTAATAAAGCAAAAGAAA (SEQ ID NO: 464)
hs02772559 [St]	AAATCAGATTTTCATGTGTGAAGAAT (SEQ ID NO: 465)
hs02772560 [St]	ACAGGGTAGGATTCATGTTTAGAAT (SEQ ID NO: 466)
hs02772561 [St]	ACATCCTCCTTACTGCCACAAGAAT (SEQ ID NO: 467)
hs02772562 [St]	GGATAGGACAGAGGACATGGAGAAT (SEQ ID NO: 468)
hs02772563 [St]	GTCTATCCTCTCCAGCATTAGAAA (SEQ ID NO: 469)
hs02772564 [St]	GTGATTATGTTACTTTTTTATAGAAA (SEQ ID NO: 470)
hs02772565 [St]	CTCTCTTTGGCAAAAGCAGCAGAAA (SEQ ID NO: 471)
hs02772566 [St]	GCAAAAGCTTTTGAGCTAATAGAAT (SEQ ID NO: 472)
hs02772567 [St]	CTGTGAAAGGATCTTAGATAAGAAT (SEQ ID NO: 473)
hs02772568 [St]	TAAGATCCTTTCACAGGAGTAGAAT (SEQ ID NO: 474)
hs02772569 [St]	ATTTGTTTCATCTTCCTCATCAGAAA (SEQ ID NO: 475)
hs02772570 [St]	TTCTACAATAAAAAATGATGAGAAT (SEQ ID NO: 476)
hs02772571 [St]	TTTTATTGTAGAATAAATGTAGAAT (SEQ ID NO: 477)
hs02772572 [St]	TTCTCATCATTTTTTTATTGTAGAAT (SEQ ID NO: 478)
hs02772573 [St]	CAAAAGCCAGGGACCATGGGAGAAT (SEQ ID NO: 479)
hs02772574 [St]	GTTCTGGGTACAGGGGTAAGAGAAA (SEQ ID NO: 480)
hs02772575 [St]	AAAAGGAGCATGAAACAGGTAGAAT (SEQ ID NO: 481)
hs02772576 [St]	CTTTTAACCAGACATCTAAGAGAAA (SEQ ID NO: 482)
hs02772577 [St]	ATCATGCAAGTGACCTAAGGAGAAT (SEQ ID NO: 483)
hs02772578 [St]	CCCAAACACAAAAATATTGAAGAAA (SEQ ID NO: 484)
hs02772579 [St]	GGCTAATTTCAACAAGGTTCAAGAAT (SEQ ID NO: 485)

**NmCas9**

<u>ID</u>	<u>ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ</u>
hs02070240 [Nm]	GAGGAAATTCCTAATTTTGTAAAAACTGGATT (SEQ ID NO: 486)
hs02070241 [Nm]	AATTGAGGCCGTATATTGGATAACACAGGATT (SEQ ID NO: 487)
hs02070242 [Nm]	TGCCTATGTGTGTGTGGGTGGGTGGCAGGATT (SEQ ID NO: 488)
hs02070243 [Nm]	AATACTATAAGATCTGAGAGGAAAAAATGATT (SEQ ID NO: 489)
hs02070244 [Nm]	AGATCTGAGAGGAAAAAATGATTGAAATGATT (SEQ ID NO: 490)
hs02070245 [Nm]	AATGATTGAAATGATTGGAGCAGGAAATGATT (SEQ ID NO: 491)

	491)
hs02070246 [Nm]	AGAAAAAGAGATTTGTAACAAACAATAGGATT (SEQ ID NO: 492)
hs02070247 [Nm]	AAATATCAGGGTAGGTGGGAGAAAAAGAGATT (SEQ ID NO: 493)
hs02070248 [Nm]	ATAGTAGAAGAAAAAGAAATAGATGTAGATT (SEQ ID NO: 494)
hs02070249 [Nm]	TCTATTCCATTCTTCACACATGAAATCTGATT (SEQ ID NO: 495)
hs02070250 [Nm]	TTCATGAGACTAGAGGTCACGAAAATCAGATT (SEQ ID NO: 496)
hs02070251 [Nm]	GGGAGTCACATGGGAGTCACAGGGTAGGATT (SEQ ID NO: 497)
hs02070252 [Nm]	CTTTGGCAAAGCAGCAGAAAGCAAACCTGATT (SEQ ID NO: 498)
hs02070253 [Nm]	CAAAAGCAGCAGAAAGCAAACCTGATTATGATT (SEQ ID NO: 499)
hs02070254 [Nm]	CTTCTGCTGCTTTTGGCAAAGAGAGGTGATT (SEQ ID NO: 500)
hs02070255 [Nm]	TGAAAACGTTGTTCTGAGTAGCTTTCAGGATT (SEQ ID NO: 501)
hs02070256 [Nm]	CATCAGAAATAGAGGCTTATGGATTTTGGATT (SEQ ID NO: 502)
hs02070257 [Nm]	TCTTCCTCATCAGAAATAGAGGCTTATGGATT (SEQ ID NO: 503)
hs02070258 [Nm]	CCTTTTACTGAGGACAGAACAAGCTCCTGATT (SEQ ID NO: 504)
hs02070259 [Nm]	ACTACAAAGGGTCTGGTCCATATTCACAGATT (SEQ ID NO: 505)
hs02070260 [Nm]	GGGCACTTAATGAGTGCTTCCCTCCTTTGATT (SEQ ID NO: 506)
hs02070261 [Nm]	CTCTTAGATGTCTGGTTAAAAGAGGTTTGATT (SEQ ID NO: 507)
hs02070262 [Nm]	TAGATCATTCTCCTTAGGTCACTTGCATGATT (SEQ ID NO: 508)
hs02070263 [Nm]	ATTTATAGTGGCTGAATGACTTCTGAATGATT (SEQ ID NO: 509)
hs02070264 [Nm]	ATATTTTTGTGTTTGGGGGATTGGCAGATT (SEQ ID NO: 510)
hs02070265 [Nm]	TTTTCTTCAATATTTTTGTGTTTGGGGGATT (SEQ ID NO: 511)

<u>ID</u>	<u>последовательность</u>
hg1223846 [SpNGCG]	TCTGCTGCCTTCCACACTCTGGCG (SEQ ID NO: 512)
hg1223847 [SpNGCG]	AGAAAGGAACATTTAGATAGAGCG (SEQ ID NO: 513)
hg1223848 [SpNGCG]	TAGCTTTTGACAGTTTTTAAGGCG (SEQ ID NO: 514)

**Cpf1**

<u>ID</u>	<u>последовательность</u>
hs19346487 [Cpf1]	TTTCTTAGTGATATTTTTCSTTTATTC (SEQ ID NO: 516)
hs19346488 [Cpf1]	TTTGTGGTATTGGTCTGAATTACAATG (SEQ ID NO: 517)
hs19346489 [Cpf1]	TTTTGTGGTATTGGTCTGAATTACAAT (SEQ ID NO: 518)
hs19346490 [Cpf1]	TTTATATAACATCTCCTTAAAACCTCAC (SEQ ID NO: 519)
hs19346491 [Cpf1]	TTTAAGGAGATGTTATATAAAGTTAAG (SEQ ID NO: 520)
hs19346492 [Cpf1]	TTTTAAGGAGATGTTATATAAAGTTAA (SEQ ID NO: 521)
hs19346493 [Cpf1]	TTTGTAAAAAACTGGATTGTGAGTTTT (SEQ ID NO: 522)
hs19346494 [Cpf1]	TTTTGTAAAAAACTGGATTGTGAGTTTT (SEQ ID NO: 523)
hs19346495 [Cpf1]	TTTCTGAGTATTAGCTTCTGCCACTAA (SEQ ID NO: 524)
hs19346496 [Cpf1]	TTTAGTGGCAGAAGCTAATACTCAGAA (SEQ ID NO: 525)
hs19346497 [Cpf1]	TTTTGGCCAAAACCTCTTAGAATACTCA (SEQ ID NO: 526)
hs19346498 [Cpf1]	TTTGGCCAAAACCTCTTAGAATACTCAA (SEQ ID NO: 527)
hs19346499 [Cpf1]	TTTGGCCAAAATGAATGTACAGCTTTA (SEQ ID NO: 528)
hs19346500 [Cpf1]	TTTTGGCCAAAATGAATGTACAGCTTT (SEQ ID NO: 529)
hs19346501 [Cpf1]	TTTTGCAGCCTTCACAAACTAGTGCTT (SEQ ID NO: 530)
hs19346502 [Cpf1]	TTTGCAGCCTTCACAAACTAGTGCTTA (SEQ ID NO: 531)
hs19346503 [Cpf1]	TTTGTGAAGGCTGCAAACTCTTGAGT (SEQ ID NO: 532)
hs19346504 [Cpf1]	TTTACAGTGAAAAGAAATATAAAATTC (SEQ ID NO: 533)
hs19346505 [Cpf1]	TTTCACTGTAAACATCATCATCTGTCA (SEQ ID NO: 534)
hs19346506 [Cpf1]	TTTTCACTGTAAACATCATCATCTGTC (SEQ ID NO: 535)
hs19346507 [Cpf1]	TTTCTTTTCACTGTAAACATCATCATC (SEQ ID NO: 536)
hs19346508 [Cpf1]	TTTATATTTCTTTTCACTGTAAACATC (SEQ ID NO: 537)
hs19346509 [Cpf1]	TTTTATATTTCTTTTCACTGTAAACAT (SEQ ID NO: 538)
hs19346510 [Cpf1]	TTTCGCCAGAGTGTGGAAGGCAGCAGA (SEQ ID NO: 539)
hs19346511 [Cpf1]	TTTACTTGCTTATTATCTGCTGCCTTC (SEQ ID NO: 540)
hs19346512 [Cpf1]	TTTGTTTACTTGCTTATTATCTGCTGC (SEQ ID NO: 541)
hs19346513 [Cpf1]	TTTGTTTGTTTACTTGCTTATTATCTG (SEQ ID NO: 542)
hs19346514 [Cpf1]	TTTTGTTTGTACTTGCTTATTATCT (SEQ ID NO: 543)
hs19346515 [Cpf1]	TTTTTGTGTGTTTACTTGCTTATTATC (SEQ ID NO: 544)
hs19346516 [Cpf1]	TTTAGTAGACTTTTTGTTTGTACTT (SEQ ID NO: 545)
hs19346517 [Cpf1]	TTTTAGTAGACTTTTTGTTTGTACT (SEQ ID NO: 546)
hs19346518 [Cpf1]	TTTTTAGTAGACTTTTTGTTTGTACT (SEQ ID NO: 547)
hs19346519 [Cpf1]	TTTAGAAAGAAAATAAAAACAGAGTAC (SEQ ID NO: 548)
hs19346520 [Cpf1]	TTTCTATTATTCAGTGGCTCAGTACTC (SEQ ID NO: 549)
hs19346521 [Cpf1]	TTTAGATAGAGCGTTGAAGGATGTCT (SEQ ID NO: 550)

hs19346522 [Cpfl]	TTTGGTGGTTAAGACATCCTTCAACCG (SEQ ID NO: 551)
hs19346523 [Cpfl]	TTTAAGCTGAACTGTGAGGTACGAAGT (SEQ ID NO: 552)
hs19346524 [Cpfl]	TTTATTAGTAAACCCAGATGCTCCAAA (SEQ ID NO: 553)
hs19346525 [Cpfl]	TTTACTAATAAATACTTCGTACCTCAC (SEQ ID NO: 554)
hs19346526 [Cpfl]	TTTGGAGCATCTGGGTTTACTAATAAAA (SEQ ID NO: 555)
hs19346527 [Cpfl]	TTTCTTCCTTTGGAGCATCTGGGTTTA (SEQ ID NO: 556)
hs19346528 [Cpfl]	TTTGAATACTATAAGATCTGAGAGGA (SEQ ID NO: 557)
hs19346529 [Cpfl]	TTTCCTCTCAGATCTTATAGTATTCCA (SEQ ID NO: 558)
hs19346530 [Cpfl]	TTTTCTCTCAGATCTTATAGTATTCC (SEQ ID NO: 559)
hs19346531 [Cpfl]	TTTTCTCTCAGATCTTATAGTATTCC (SEQ ID NO: 560)
hs19346532 [Cpfl]	TTTTTCTCTCAGATCTTATAGTATT (SEQ ID NO: 561)
hs19346533 [Cpfl]	TTTCAATCATTTTTCTCTCAGATCT (SEQ ID NO: 562)
hs19346534 [Cpfl]	TTTCCTGCTCCAATCATTTCAATCATT (SEQ ID NO: 563)
hs19346535 [Cpfl]	TTTTTTAAGTAAAGTACATAATTATAG (SEQ ID NO: 564)
hs19346536 [Cpfl]	TTTTTAAGTAAAGTACATAATTATAGT (SEQ ID NO: 565)
hs19346537 [Cpfl]	TTTTAAGTAAAGTACATAATTATAGTT (SEQ ID NO: 566)
hs19346538 [Cpfl]	TTTAAGTAAAGTACATAATTATAGTTT (SEQ ID NO: 567)
hs19346539 [Cpfl]	TTTTATATACTATGAATACACAGGAGG (SEQ ID NO: 568)
hs19346540 [Cpfl]	TTTATATACTATGAATACACAGGAGGG (SEQ ID NO: 569)
hs19346541 [Cpfl]	TTTCCCTCCTGTGTATTCATAGTATAT (SEQ ID NO: 570)
hs19346542 [Cpfl]	TTTTCCCTCCTGTGTATTCATAGTATA (SEQ ID NO: 571)
hs19346543 [Cpfl]	TTTTAAATATCTTTCTATCCATTTTTT (SEQ ID NO: 572)
hs19346544 [Cpfl]	TTTTAAATATCTTTCTATCCATTTTTT (SEQ ID NO: 573)
hs19346545 [Cpfl]	TTTTAAACACCCTCAGCCTCCTGTTTT (SEQ ID NO: 574)
hs19346546 [Cpfl]	TTTCTATCCATTTTTTTCTTCCTTTCA (SEQ ID NO: 575)
hs19346547 [Cpfl]	TTTTTTTCTTCCTTTTCATCCTTTTTTCA (SEQ ID NO: 576)
hs19346548 [Cpfl]	TTTTTTCTTCCTTTTCATCCTTTTTTCA (SEQ ID NO: 577)
hs19346549 [Cpfl]	TTTTTCTTCCTTTTCATCCTTTTTTCA (SEQ ID NO: 578)
hs19346550 [Cpfl]	TTTTTCTTCCTTTTCATCCTTTTTTCA (SEQ ID NO: 579)
hs19346551 [Cpfl]	TTTCTTCCTTTTCATCCTTTTTTCA (SEQ ID NO: 580)
hs19346552 [Cpfl]	TTTCATCCTTTTTTTCACAGGATAATCCT (SEQ ID NO: 581)
hs19346553 [Cpfl]	TTTTTTCACAGGATAATCCTATTGTTTG (SEQ ID NO: 582)
hs19346554 [Cpfl]	TTTTTTCACAGGATAATCCTATTGTTTGT (SEQ ID NO: 583)
hs19346555 [Cpfl]	TTTCACAGGATAATCCTATTGTTTGT (SEQ ID NO: 584)
hs19346556 [Cpfl]	TTTGTTACAAATCTCTTTTTTCTCCCAC (SEQ ID NO: 585)
hs19346557 [Cpfl]	TTTGTAACAAACAATAGGATTATCCTG (SEQ ID NO: 586)
hs19346558 [Cpfl]	TTTTTCTCCCACCTACCCTGATATTTTT (SEQ ID NO: 587)
hs19346559 [Cpfl]	TTTTTCTCCCACCTACCCTGATATTTTTG (SEQ ID NO: 588)
hs19346560 [Cpfl]	TTTCTCCCACCTACCCTGATATTTTTGC (SEQ ID NO: 589)
hs19346561 [Cpfl]	TTTTGCTATTTCCCTTATTACCACTTT (SEQ ID NO: 590)
hs19346562 [Cpfl]	TTTGCTATTTCCCTTATTACCACTTTC (SEQ ID NO: 591)

hs19346563 [Cpfl]	TTTCCCTTATTACCACTTTTCATCTCTT (SEQ ID NO: 592)
hs19346564 [Cpfl]	TTTCATCTCTTATCTTTCATCACTCTCT (SEQ ID NO: 593)
hs19346565 [Cpfl]	TTTAGAGTTACTAGGGAGAGAGTGATG (SEQ ID NO: 594)
hs19346566 [Cpfl]	TTTTCTTTCCCTCCTCCTGAAACTTCA (SEQ ID NO: 595)
hs19346567 [Cpfl]	TTTCTTTCCCTCCTCCTGAAACTTCAC (SEQ ID NO: 596)
hs19346568 [Cpfl]	TTTCCCTCCTCCTGAAACTTCACTGGT (SEQ ID NO: 597)
hs19346569 [Cpfl]	TTTCAGGAGGAGGGAAAGAAAATTTAG (SEQ ID NO: 598)
hs19346570 [Cpfl]	TTTAAAGGAGACCAGTGAAGTTTCAGG (SEQ ID NO: 599)
hs19346571 [Cpfl]	TTTTAAAGGAGACCAGTGAAGTTTCAG (SEQ ID NO: 600)
hs19346572 [Cpfl]	TTTTTAAAGGAGACCAGTGAAGTTTCA (SEQ ID NO: 601)
hs19346573 [Cpfl]	TTTTTTAAAGGAGACCAGTGAAGTTTC (SEQ ID NO: 602)
hs19346574 [Cpfl]	TTTTTTTTAAAGGAGACCAGTGAAGTTT (SEQ ID NO: 603)
hs19346575 [Cpfl]	TTTTTTTTTAAAGGAGACCAGTGAAGTT (SEQ ID NO: 604)
hs19346576 [Cpfl]	TTTTTTTTTTAAAGGAGACCAGTGAAGT (SEQ ID NO: 605)
hs19346577 [Cpfl]	TTTTTTTTTTTTAAAGGAGACCAGTGAAG (SEQ ID NO: 606)
hs19346578 [Cpfl]	TTTTTTTTTTTTTAAAGGAGACCAGTGAA (SEQ ID NO: 607)
hs19346579 [Cpfl]	TTTTTTTTTTTTTTAAAGGAGACCAGTGA (SEQ ID NO: 608)
hs19346580 [Cpfl]	TTTTTTTTTTTTTTTTAAAGGAGACCAGTG (SEQ ID NO: 609)
hs19346581 [Cpfl]	TTTCTTTTTTCTTCTACTATCAAATTT (SEQ ID NO: 610)
hs19346582 [Cpfl]	TTTTTCTTCTACTATCAAATTTCAAG (SEQ ID NO: 611)
hs19346583 [Cpfl]	TTTTTCTTCTACTATCAAATTTCAAGT (SEQ ID NO: 612)
hs19346584 [Cpfl]	TTTTCTTCTACTATCAAATTTCAAGTT (SEQ ID NO: 613)
hs19346585 [Cpfl]	TTTCTTCTACTATCAAATTTCAAGTTT (SEQ ID NO: 614)
hs19346586 [Cpfl]	TTTGATAGTAGAAGAAAAAGAAATAG (SEQ ID NO: 615)
hs19346587 [Cpfl]	TTTCAAGTTTTTCTTTTGCTTTATTAC (SEQ ID NO: 616)
hs19346588 [Cpfl]	TTTTTCTTTTGCTTTATTACCCATCCA (SEQ ID NO: 617)
hs19346589 [Cpfl]	TTTTCTTTTGCTTTATTACCCATCCAG (SEQ ID NO: 618)
hs19346590 [Cpfl]	TTTCTTTTGCTTTATTACCCATCCAGT (SEQ ID NO: 619)
hs19346591 [Cpfl]	TTTTGCTTTATTACCCATCCAGTTTTT (SEQ ID NO: 620)
hs19346592 [Cpfl]	TTTGCTTTATTACCCATCCAGTTTTTG (SEQ ID NO: 621)
hs19346593 [Cpfl]	TTTATTACCCATCCAGTTTTTGATTT (SEQ ID NO: 622)
hs19346594 [Cpfl]	TTTTTGATTTTCTTATTATCTATTCC (SEQ ID NO: 623)
hs19346595 [Cpfl]	TTTTGTATTTCTTATTATCTATTCCA (SEQ ID NO: 624)
hs19346596 [Cpfl]	TTTGTATTTCTTATTATCTATTCCAT (SEQ ID NO: 625)
hs19346597 [Cpfl]	TTTCCTTATTATCTATTCCATTCTTCA (SEQ ID NO: 626)
hs19346598 [Cpfl]	TTTCATGTGTGAAGAATGGAATAGATA (SEQ ID NO: 627)
hs19346599 [Cpfl]	TTTTCGTGACCTCTAGTCTCATGAACC (SEQ ID NO: 628)
hs19346600 [Cpfl]	TTTCGTGACCTCTAGTCTCATGAACCT (SEQ ID NO: 629)
hs19346601 [Cpfl]	TTTACCTCTCAAAAAGCAACAATAATT (SEQ ID NO: 630)
hs19346602 [Cpfl]	TTTGAGAGGTAAAGGTTTCATGAGACTA (SEQ ID NO: 631)
hs19346603 [Cpfl]	TTTTGAGAGGTAAAGGTTTCATGAGACT (SEQ ID NO: 632)

hs19346604 [Cpfl]	TTTTTGAGAGGTAAAGGTTTCATGAGAC (SEQ ID NO: 633)
hs19346605 [Cpfl]	TTTCCTAAGCACCATATTTGACACCAC (SEQ ID NO: 634)
hs19346606 [Cpfl]	TTTGACACCACATGCACTGTGGCTCTC (SEQ ID NO: 635)
hs19346607 [Cpfl]	TTTTACCCTTCAGGTAACCGGTAGCTT (SEQ ID NO: 636)
hs19346608 [Cpfl]	TTTACCCTTCAGGTAACCGGTAGCTTT (SEQ ID NO: 637)
hs19346609 [Cpfl]	TTTTGACAGTTTTTAAGGCGGGGAGTC (SEQ ID NO: 638)
hs19346610 [Cpfl]	TTTGACAGTTTTTAAGGCGGGGAGTCA (SEQ ID NO: 639)
hs19346611 [Cpfl]	TTTTTAAGGCGGGGAGTCACATGGGAG (SEQ ID NO: 640)
hs19346612 [Cpfl]	TTTTAAGGCGGGGAGTCACATGGGAGT (SEQ ID NO: 641)
hs19346613 [Cpfl]	TTTAAGGCGGGGAGTCACATGGGAGTC (SEQ ID NO: 642)
hs19346614 [Cpfl]	TTTAGAATGATCATTCTTGTGGCAGTA (SEQ ID NO: 643)
hs19346615 [Cpfl]	TTTATTGTGGCAGCCATTATTCCTGTC (SEQ ID NO: 644)
hs19346616 [Cpfl]	TTTATTATCTTTATTGTGGCAGCCATT (SEQ ID NO: 645)
hs19346617 [Cpfl]	TTTTATTATCTTTATTGTGGCAGCCAT (SEQ ID NO: 646)
hs19346618 [Cpfl]	TTTTTATTATCTTTATTGTGGCAGCCA (SEQ ID NO: 647)
hs19346619 [Cpfl]	TTTTTTATTATCTTTATTGTGGCAGCC (SEQ ID NO: 648)
hs19346620 [Cpfl]	TTTATTTTTTATTATCTTTATTGTGGC (SEQ ID NO: 649)
hs19346621 [Cpfl]	TTTTATTTTTTATTATCTTTATTGTGG (SEQ ID NO: 650)
hs19346622 [Cpfl]	TTTAGGAAAGATGAAAATACTCTTTG (SEQ ID NO: 651)
hs19346623 [Cpfl]	TTTGGGAAAATGATAACGTTAACATC (SEQ ID NO: 652)
hs19346624 [Cpfl]	TTTCCCAAAGAGTATTTTTTCATCTTTC (SEQ ID NO: 653)
hs19346625 [Cpfl]	TTTTCCCAAAGAGTATTTTTTCATCTTT (SEQ ID NO: 654)
hs19346626 [Cpfl]	TTTAACGTTATCATTTTTCCCAAAGAGT (SEQ ID NO: 655)
hs19346627 [Cpfl]	TTTCTAATGCTGGAGAGGATAGGACAG (SEQ ID NO: 656)
hs19346628 [Cpfl]	TTTCCATTCTCCATGTCCTCTGTCCTA (SEQ ID NO: 657)
hs19346629 [Cpfl]	TTTTCCATTCTCCATGTCCTCTGTCCT (SEQ ID NO: 658)
hs19346630 [Cpfl]	TTTTTCCATTCTCCATGTCCTCTGTCC (SEQ ID NO: 659)
hs19346631 [Cpfl]	TTTTTTCCATTCTCCATGTCCTCTGTC (SEQ ID NO: 660)
hs19346632 [Cpfl]	TTTTTTTCCATTCTCCATGTCCTCTGT (SEQ ID NO: 661)
hs19346633 [Cpfl]	TTTATTTTTTTCCATTCTCCATGTCCT (SEQ ID NO: 662)
hs19346634 [Cpfl]	TTTAGTGTGGTGATAATTTATTTTTTTT (SEQ ID NO: 663)
hs19346635 [Cpfl]	TTTTCTATAAAAAGTAACATAATCACC (SEQ ID NO: 664)
hs19346636 [Cpfl]	TTTCTATAAAAAGTAACATAATCACCT (SEQ ID NO: 665)
hs19346637 [Cpfl]	TTTATAGAAAATTATGCCTATTTAGTG (SEQ ID NO: 666)
hs19346638 [Cpfl]	TTTTATAGAAAATTATGCCTATTTAGT (SEQ ID NO: 667)
hs19346639 [Cpfl]	TTTTTATAGAAAATTATGCCTATTTAG (SEQ ID NO: 668)
hs19346640 [Cpfl]	TTTGGCAAAGCAGCAGAAAGCAAAC (SEQ ID NO: 669)
hs19346641 [Cpfl]	TTTGCCAAAGAGAGGTGATTATGTTAC (SEQ ID NO: 670)
hs19346642 [Cpfl]	TTTGGCAAAGAGAGGTGATTATGTTA (SEQ ID NO: 671)
hs19346643 [Cpfl]	TTTCTGCTGCTTTTGGCAAAGAGAGGT (SEQ ID NO: 672)
hs19346644 [Cpfl]	TTTGCTTTCTGCTGCTTTTGGCAAAGA (SEQ ID NO: 673)

hs19346645 [Cpfl]	TTTAGAAGTAATCATAATCAGTTTGCT (SEQ ID NO: 674)
hs19346646 [Cpfl]	TTTATCAATATTATTTAGAAGTAATCA (SEQ ID NO: 675)
hs19346647 [Cpfl]	TTTAGTAGGAATCCTGAAAGCTACTCA (SEQ ID NO: 676)
hs19346648 [Cpfl]	TTTCAGGATTCTACTAAATTATGAGT (SEQ ID NO: 677)
hs19346649 [Cpfl]	TTTTCATTTACTGAATGTGTCTCTATG (SEQ ID NO: 678)
hs19346650 [Cpfl]	TTTCATTTACTGAATGTGTCTCTATGA (SEQ ID NO: 679)
hs19346651 [Cpfl]	TTTACTGAATGTGTCTCTATGAGCCAG (SEQ ID NO: 680)
hs19346652 [Cpfl]	TTTGCTGGCTCATAGAGACACATTCA (SEQ ID NO: 681)
hs19346653 [Cpfl]	TTTTGCTGGCTCATAGAGACACATTCA (SEQ ID NO: 682)
hs19346654 [Cpfl]	TTTTGAGCTAATAGAATTAGATCTTAT (SEQ ID NO: 683)
hs19346655 [Cpfl]	TTTGAGCTAATAGAATTAGATCTTATT (SEQ ID NO: 684)
hs19346656 [Cpfl]	TTTCACAGGAGTAGAATAAGATCTAAT (SEQ ID NO: 685)
hs19346657 [Cpfl]	TTTGGATTATTCTTATCTAAGATCCTT (SEQ ID NO: 686)
hs19346658 [Cpfl]	TTTTGGATTATTCTTATCTAAGATCCT (SEQ ID NO: 687)
hs19346659 [Cpfl]	TTTCTGATGAGGAAGATGAACAAATCA (SEQ ID NO: 688)
hs19346660 [Cpfl]	TTTGTTTCATCTTCCTCATCAGAAATAG (SEQ ID NO: 689)
hs19346661 [Cpfl]	TTTACTGAGGACAGAACAAGCTCCTGA (SEQ ID NO: 690)
hs19346662 [Cpfl]	TTTTACTGAGGACAGAACAAGCTCCTG (SEQ ID NO: 691)
hs19346663 [Cpfl]	TTTGTAGTTATCTTACAGCCACTTGAA (SEQ ID NO: 692)
hs19346664 [Cpfl]	TTTATTCTACAATAAAAAATGATGAGA (SEQ ID NO: 693)
hs19346665 [Cpfl]	TTTATTGTAGAATAAATGTAGAATTTT (SEQ ID NO: 694)
hs19346666 [Cpfl]	TTTTATTGTAGAATAAATGTAGAATTT (SEQ ID NO: 695)
hs19346667 [Cpfl]	TTTTTATTGTAGAATAAATGTAGAATT (SEQ ID NO: 696)
hs19346668 [Cpfl]	TTTTTTATTGTAGAATAAATGTAGAAT (SEQ ID NO: 697)
hs19346669 [Cpfl]	TTTACAGAGTGCATCCATGGTCCAGGA (SEQ ID NO: 698)
hs19346670 [Cpfl]	TTTCAGCTACTGTTGGCTACATCCATT (SEQ ID NO: 699)
hs19346671 [Cpfl]	TTTGTTCCCTTGAATGGATGTAGCCAA (SEQ ID NO: 700)
hs19346672 [Cpfl]	TTTTGTTCCCTTGAATGGATGTAGCCA (SEQ ID NO: 701)
hs19346673 [Cpfl]	TTTGTTCTGGGTACAGGGGTAAGAGAA (SEQ ID NO: 702)
hs19346674 [Cpfl]	TTTCTCTTACCCCTGTACCCAGAACAA (SEQ ID NO: 703)
hs19346675 [Cpfl]	TTTGATTACAATATTCTACCTGTTTCA (SEQ ID NO: 704)
hs19346676 [Cpfl]	TTTCATGCTCCTTTTTCTCTTAGATGT (SEQ ID NO: 705)
hs19346677 [Cpfl]	TTTTTCTCTTAGATGTCTGGTTAAAAG (SEQ ID NO: 706)
hs19346678 [Cpfl]	TTTTCTCTTAGATGTCTGGTTAAAAGA (SEQ ID NO: 707)
hs19346679 [Cpfl]	TTTCTCTTAGATGTCTGGTTAAAAGAG (SEQ ID NO: 708)
hs19346680 [Cpfl]	TTTAACCAGACATCTAAGAGAAAAAGG (SEQ ID NO: 709)
hs19346681 [Cpfl]	TTTTAACCAGACATCTAAGAGAAAAAG (SEQ ID NO: 710)
hs19346682 [Cpfl]	TTTGATTACAGCTAAATCATGCAAGTGA (SEQ ID NO: 711)
hs19346683 [Cpfl]	TTTAGCTGAATCAAACCTCTTTTAACC (SEQ ID NO: 712)
hs19346684 [Cpfl]	TTTATAGTGGCTGAATGACTTCTGAAT (SEQ ID NO: 713)
hs19346685 [Cpfl]	TTTGTTCCACATAACACACACACACA (SEQ ID NO: 714)

hs19346686 [Cp f1]	TTTTGTTCCACATAACACACACACAC (SEQ ID NO: 715)
hs19346687 [Cp f1]	TTTATAACTAAACTGAATGAATAATAT (SEQ ID NO: 716)
hs19346688 [Cp f1]	TTTAGTTATAAATATTTTGTTCACACA (SEQ ID NO: 717)
hs19346689 [Cp f1]	TTTAACAGAGATATAATTATCCATATT (SEQ ID NO: 718)
hs19346690 [Cp f1]	TTTATATAAATGCAGGCAAACCTTAAT (SEQ ID NO: 719)
hs19346691 [Cp f1]	TTTATATAAATTTAACAGAGATATAAT (SEQ ID NO: 720)
hs19346692 [Cp f1]	TTTGCCTGCATTTATATAAATTTAACA (SEQ ID NO: 721)
hs19346693 [Cp f1]	TTTAATTTAAATCTGCCAATCCCCC (SEQ ID NO: 722)
hs19346694 [Cp f1]	TTTAATTTAAAGTTTGCCTGCATTTATA (SEQ ID NO: 723)
hs19346695 [Cp f1]	TTTTAATTTAAAGTTTGCCTGCATTTAT (SEQ ID NO: 724)
hs19346696 [Cp f1]	TTTGGCAGATTTTAATTTAAAGTTTGCC (SEQ ID NO: 725)
hs19346697 [Cp f1]	TTTGGGGGGATTTGGCAGATTTTAATT (SEQ ID NO: 726)
hs19346698 [Cp f1]	TTTGTGTTTGGGGGGATTTGGCAGATT (SEQ ID NO: 727)
hs19346699 [Cp f1]	TTTTGTGTTTGGGGGGATTTGGCAGAT (SEQ ID NO: 728)
hs19346700 [Cp f1]	TTTTTGTGTTTGGGGGGATTTGGCAGA (SEQ ID NO: 729)
hs19346701 [Cp f1]	TTTCTTCAATATTTTGTGTTTGGGGG (SEQ ID NO: 730)
hs19346702 [Cp f1]	TTTTCTTCAATATTTTGTGTTTGGGGG (SEQ ID NO: 731)
hs19346703 [Cp f1]	TTTTCTTCAATATTTTGTGTTTGGG (SEQ ID NO: 732)
hs19346704 [Cp f1]	TTTCACAAGTTTCAAGAATCACACAAA (SEQ ID NO: 733)
hs19346705 [Cp f1]	TTTGTGTGATTCTTGAACCTTGTGAAA (SEQ ID NO: 734)

**Таблица 5: Мишени в случае LCA10**

<u>ID</u>	<u>последовательность</u>
SaCas9	CACCTGGCCCCAGTTGTAATTGTGAGT (SEQ ID NO: 735)
SpCas9 (VQR)	CCTGGCCCCAGTTGTAATTGTGA (SEQ ID NO: 736)
SpCas9 (EQR)	CCTGGCCCCAGTTGTAATTGTGAG (SEQ ID NO: 737)
hs028893108*	GAGATACTCACAATTACAACCTGG (SEQ ID NO: 738)

**Таблица 8: Экзонные сайты-мишени в MAP3K12 (DLK)**

SpCas9

<u>ID</u>	<u>последовательность</u>	<u>ЭКЗОН</u>
hs027563580	CGGCCAGGCTCTCACCTCGGGGG (SEQ ID NO: 788)	1
hs027563586	CTCTCACCTCGGGGGCTCCGCGG (SEQ ID NO: 789)	1
hs027563601	GCTGCCCTCCACCGGACCCGGGG (SEQ ID NO: 790)	1
hs027563599	CAGCGCCGCTTTTGTGCTGCGG (SEQ ID NO: 791)	1
hs027563587	AGCCTGGCCGAGTTGTGGGGGG (SEQ ID NO: 792)	1
hs027563588	GAGCCTGGCCGAGTTGTGGGGGG (SEQ ID NO: 793)	1
hs027563610	CATCGCCTGTGACAGCGCCCCGG (SEQ ID NO: 794)	1
hs027563611	TCGTGCGGTGTCCGGATGCACGG (SEQ ID NO: 795)	1
hs027563595	CGCGGCCGAGCACAAGGCGG (SEQ ID NO: 796)	1
hs027563596	CTGCGGCCGCGGAGCCCCGAGG (SEQ ID NO: 797)	1
hs027563623	GCAGGGACGGGGCTAGGGGTCGG (SEQ ID NO: 798)	1

hs027563598	GCGCTGCTGCAGCTCCGCTCCGG (SEQ ID NO: 799)	1
hs027563597	CGCCTTTTGTGCTGCGGCCGCGG (SEQ ID NO: 801)	1
hs027562294	AGGGTGTTCGGGTCTCATGGAGG (SEQ ID NO: 802)	2
hs027562271	TCTCGAAGTACACACTGGGTAGG (SEQ ID NO: 803)	2
hs027562307	ACCATCATAACCAGGGGCCAGAGG (SEQ ID NO: 804)	2
hs027562245	ACTGTTGGCAAAAGGCTCAGGGG (SEQ ID NO: 8058)	2
hs027562237	CTACATGAGCAGGATGCAGGGGG (SEQ ID NO: 806)	2
hs027562290	CTTTGTGTCTACCCTAAGTGAGG (SEQ ID NO: 807)	2
hs027562267	CCACATCTCGAAGTACACACTGG (SEQ ID NO: 808)	2
hs027562268	CACATCTCGAAGTACACACTGGG (SEQ ID NO: 809)	2
hs027562210	TGCCAATCATGGTCCAGACAGGG (SEQ ID NO: 810)	2
hs027562274	CTTCGAGATGTGGTACCCCTTGG (SEQ ID NO: 811)	2
hs027562224	ATCCAGAGTTCGAGCTGACGAGG (SEQ ID NO: 812)	2
hs027562246	CTGTTGGCAAAAGGCTCAGGGGG (SEQ ID NO: 813)	2
hs027562211	TCATGGTCCAGACAGGGCGCAGG (SEQ ID NO: 814)	2
hs027562259	CCCCACCCTGCCACCAAGGGG (SEQ ID NO: 815)	2
hs027562280	GAGTGCAGTCAGAAGTGTCTGGG (SEQ ID NO: 816)	2
hs027562282	GTCTGGGTCCAGCTTGCGCATGG (SEQ ID NO: 817)	2
hs027562278	GTAGGCGTCAGGTCCCTTCTCGGG (SEQ ID NO: 818)	2
hs027562238	GCTACATGAGCAGGATGCAGGGG (SEQ ID NO: 819)	2
hs027562203	CTGCTGCTGCTTGTGCTCAGTGG (SEQ ID NO: 820)	2
hs027562302	CCTGGTATGATGGTGAACACTGG (SEQ ID NO: 821)	2
hs027562256	GGGCCAGCCCTCCCCAGGTGG (SEQ ID NO: 822)	2
hs027562295	ACACCCTCTCCTTCTTTGGGGG (SEQ ID NO: 823)	2
hs027562239	AGCTACATGAGCAGGATGCAGGG (SEQ ID NO: 824)	2
hs027562247	TTGGCAAAAGGCTCAGGGGGCGG (SEQ ID NO: 825)	2
hs027562205	ACAAGCAGCAGCAGGAAGGTAGG (SEQ ID NO: 826)	2
hs027562209	TTGCCAATCATGGTCCAGACAGG (SEQ ID NO: 827)	2
hs027562284	GCGCATGGATGCCTCACTTAGGG (SEQ ID NO: 828)	2
hs027562220	CTGCAGTGCCAGAGTGGCAGTGG (SEQ ID NO: 829)	2
hs027562258	TCCCCACCCTGCCACCAAGGG (SEQ ID NO: 830)	2
hs027562218	AGTGGCAGTGGCTTCCCTTGAGGG (SEQ ID NO: 831)	2
hs027562221	CACCTCGTCAGCTCGAACTCTGG (SEQ ID NO: 832)	2
hs027562253	GCGGCTCTCCACCTGGGGAGGGG (SEQ ID NO: 833)	2
hs027562124	GGTCCAGGATTTCTCAAAGGGG (SEQ ID NO: 834)	3
hs027562099	TCACTTTCAAGTGAGGTCCAGGG (SEQ ID NO: 835)	3
hs027562131	GGAAATCCTGGACCTGCAGTGGG (SEQ ID NO: 836)	3
hs027562104	TCACAGCCACCTCCTCCCCGTGG (SEQ ID NO: 837)	3
hs027562101	AACATCATCACTTTCAAGTGAGG (SEQ ID NO: 838)	3
hs027562130	CCTCAAAGGGGACCTCCCAAAGG (SEQ ID NO: 839)	3
hs027562112	CTTCTGGGGCGCTTCCACGGGG (SEQ ID NO: 840)	3

hs027562111	CCTGGGGCGCTTCCACGGGGAGG (SEQ ID NO: 841)	3
hs027562102	CTTTCGCAAGTGCTTGATGTCGG (SEQ ID NO: 842)	3
hs027562132	AGGAAATCCTGGACCTGCAGTGG (SEQ ID NO: 843)	3
hs027562096	TCAAGTGAGGTCCAGGGCAGGGG (SEQ ID NO: 844)	3
hs027562103	GCTTGATGTCGGTTTCTTTGAGG (SEQ ID NO: 845)	3
hs027562108	GCGCTTCCACGGGGAGGAGGTGG (SEQ ID NO: 846)	3
hs027562006	TGGGTGACTTGAGATCCCTGTGG (SEQ ID NO: 847)	4
hs027562034	CCTGGGCGCAGAACTCCATGAGG (SEQ ID NO: 848)	4
hs027562011	CCTGCACAAGATTATCCACAGGG (SEQ ID NO: 849)	4
hs027562023	GTAAGGAGGGGGTGACAGGGCGG (SEQ ID NO: 850)	4
hs027562017	ACCAGTCAACCAGTAAGGAGGGG (SEQ ID NO: 851)	4
hs027562018	CCAGTCAACCAGTAAGGAGGGG (SEQ ID NO: 852)	4
hs027562015	GGACCAGTCAACCAGTAAGGAGG (SEQ ID NO: 853)	4
hs027562037	TCCATGAGGATGCAGTAGCAGGG (SEQ ID NO: 854)	4
hs027562012	ACCTGCACAAGATTATCCACAGG (SEQ ID NO: 855)	4
hs027562016	GACCAGTCAACCAGTAAGGAGGG (SEQ ID NO: 856)	4
hs027562010	GGATAATCTTGTGCAGGTGCAGG (SEQ ID NO: 857)	4
hs027562042	TCCCTGCTACTGCATCCTCATGG (SEQ ID NO: 858)	4
hs027562033	GCCAGCTGTATGAGGTACTGCGG (SEQ ID NO: 859)	4
hs027562007	CCCAAGTGAGTAAGCAAGCAGGG (SEQ ID NO: 860)	4
hs027562032	CCAGCTGTATGAGGTACTGCGGG (SEQ ID NO: 861)	4
hs027562041	GATGCAGTAGCAGGGAGCCTGGG (SEQ ID NO: 862)	4
hs027562030	TACCTCATAACAGCTGGCCCTGGG (SEQ ID NO: 863)	4
hs027562024	TTACTGGTTGACTGGTCCATGGG (SEQ ID NO: 864)	4
hs027562029	GTACCTCATAACAGCTGGCCCTGG (SEQ ID NO: 865)	4
hs027562044	GCCTGGGTGCACACACCCTGGG (SEQ ID NO: 866)	4
hs027561949	TTCATTGCGGATCACCTCAGGGG (SEQ ID NO: 867)	5
hs027561945	TCTCAGACACAGGTTTCATTGCGG (SEQ ID NO: 868)	5
hs027561953	AGTAGCCTGGATGGCCCTGAGG (SEQ ID NO: 869)	5
hs027561948	GTTTCATTGCGGATCACCTCAGGG (SEQ ID NO: 870)	5
hs027561943	ATGTCGACCTTCTCAGACACAGG (SEQ ID NO: 871)	5
hs027561963	GTCGTAGGTGATTAGCATGCTGG (SEQ ID NO: 872)	5
hs027561946	TGTCTGAGAAGGTCGACATCTGG (SEQ ID NO: 873)	5
hs027561956	CCTTTGCAGGGACAGTAGCCTGG (SEQ ID NO: 874)	5
hs027561957	GCTCTTGTCACTCAGCTCCTTGG (SEQ ID NO: 875)	5
hs027561911	AGGAATCTACGTCTTTGTAGGGG (SEQ ID NO: 876)	6
hs027561918	GCACCACGCCAAAGGACCTAGGG (SEQ ID NO: 877)	6
hs027561900	GAAACCATCTGGGCAACTGGAGG (SEQ ID NO: 878)	6
hs027561903	TCTGGGCAACTGGAGGGCACGGG (SEQ ID NO: 879)	6
hs027561821	TGTGGAGAGTACATCAGCTGAGG (SEQ ID NO: 880)	7
hs027561815	GACTTAAAGTAAGTCTCCTGGGG (SEQ ID NO: 881)	7

hs027561824	CCAGATGCAGCAGGATCTGTTCGG (SEQ ID NO: 882)	7
hs027561823	AGGCAATGTCCAGATGCAGCAGG (SEQ ID NO: 883)	7
hs027561818	TTAAGTCCCAGGTGTGCTGTGGG (SEQ ID NO: 884)	7
hs027561822	TGATGTACTCTCCACACCCCAGG (SEQ ID NO: 885)	7
hs027561826	GCAGGATCTGTCCGAATGATGGG (SEQ ID NO: 886)	7
hs027561762	TCACCAGTTCCCTCTTCTAGGCGG (SEQ ID NO: 887)	8
hs027561770	CTGTCTGCACCGCCTAGAAGAGG (SEQ ID NO: 888)	8
hs027561771	TTGAAAAGATTAAGTCAGAAGGG (SEQ ID NO: 889)	8
hs027561756	GTGAGTTCCCGTGCTTGGGGAGG (SEQ ID NO: 890)	8
hs027561769	GCACCGCCTAGAAGAGGAACTGG (SEQ ID NO: 891)	8
hs027561707	GAGTTCCAGCTGCAACATGAGGG (SEQ ID NO: 892)	9
hs027561718	GGAGCACTATGAAAAGGAACTGG (SEQ ID NO: 893)	9
hs027561656	AAGGTGGGACATGAGTACTGTGG (SEQ ID NO: 894)	10
hs027561669	CCTCCTGCATGGAAACACAATGG (SEQ ID NO: 895)	10
hs027561659	TGTCACCCCATAGCAAAAAGGTGG (SEQ ID NO: 896)	10
hs027561658	GTCACCCCATAGCAAAAAGGTGGG (SEQ ID NO: 897)	10
hs027561674	CTGAAGCCACACCCTTCCCGGGG (SEQ ID NO: 898)	10
hs027561663	TGGAGAAGCTTATCAAGAAGAGG (SEQ ID NO: 899)	10
hs027561655	ATGTCCCACCTTTTGTCTATGGGG (SEQ ID NO: 900)	10
hs027561657	CTATGGGGTGACAGCTTCTGTGG (SEQ ID NO: 901)	10
hs027561660	AGCTGTCACCCCATAGCAAAAAGG (SEQ ID NO: 902)	10
hs027561665	GTTTCCATGCAGGAGGCCCGGG (SEQ ID NO: 903)	10
hs027561662	CCATTGTGTTTCCATGCAGGAGG (SEQ ID NO: 904)	10
hs027561667	CATGCAGGAGGCCCGGGAAAGGG (SEQ ID NO: 905)	10
hs027561675	GCTGAAGCCACACCCTTCCCGGG (SEQ ID NO: 906)	10
hs027561653	CATGTCCCACCTTTTGTCTATGGG (SEQ ID NO: 907)	10
hs027561589	GTGCCACCCCATGAACCTGGAGG (SEQ ID NO: 908)	11
hs027561554	GGTCATGATGAAGCCCACGGAGG (SEQ ID NO: 909)	11
hs027561480	CCTTCACCAGGCCCTACTGGAGG (SEQ ID NO: 910)	11
hs027561505	ACCAGCCCAGATTCACCTGGGGG (SEQ ID NO: 911)	11
hs027561584	TGGAGGACCAGGAAGCCCAGGGG (SEQ ID NO: 912)	11
hs027561553	GGAGGTCATGATGAAGCCCACGG (SEQ ID NO: 913)	11
hs027561615	TCACCAGGACGGAGTCGCCGTGG (SEQ ID NO: 914)	11
hs027561630	ACTAGATGCAGCCCTGAGTGGGG (SEQ ID NO: 915)	11
hs027561451	AAGTCAGGTAAAAGTATGGGAAGG (SEQ ID NO: 916)	11
hs027561545	TCAGCAGCACTAGGGTCCCGGGG (SEQ ID NO: 917)	11
hs027561617	AGGGCCCCCCTCACCAGGACGG (SEQ ID NO: 918)	11
hs027561583	GGAGGACCAGGAAGCCCAGGGGG (SEQ ID NO: 919)	11
hs027561552	AAGACATTTTTCGGAGCAGGAGG (SEQ ID NO: 920)	11
hs027561493	GGGAACCACCTCCTCCAGTAGGG (SEQ ID NO: 921)	11
hs027561548	ACCTGCTGTCAGCAGCACTAGGG (SEQ ID NO: 922)	11

hs027561452	CCCGAAGTCAGGTAAAAGTATGGG (SEQ ID NO: 923)	11
hs027561475	TTCTGGGAACTGGAAGGGAAAGG (SEQ ID NO: 924)	11
hs027561607	TGGCAAGACCCGTCACCGCAAGG (SEQ ID NO: 925)	11
hs027561555	GTCATGATGAAGCCACGGAGGG (SEQ ID NO: 926)	11
hs027561450	CTTTACCTGACTTCGGGTGACGG (SEQ ID NO: 927)	11
hs027561507	CCACCAGCCCAGATTCACCTGGG (SEQ ID NO: 928)	11
hs027561613	GACTCCGTCCCTGGTGAGGGGGGG (SEQ ID NO: 929)	11
hs027561620	AGGAAGCCCCACCCACTCAGGG (SEQ ID NO: 930)	11
hs027561581	GGTCCTCCAGGTTTCATGGGGTGG (SEQ ID NO: 931)	11
hs027561522	GGCTCACACCTCCGGCCCGGGG (SEQ ID NO: 932)	11
hs027561490	CCTCCAGTAGGGCTGGTGAAGG (SEQ ID NO: 933)	11
hs027561605	TCACCGCAAGGCCAGCGCCAAGG (SEQ ID NO: 934)	11
hs027561591	GCTGTGCCACCCCATGAACCTGG (SEQ ID NO: 935)	11
hs027561550	GGGACGATGAAGACATTTTGCGG (SEQ ID NO: 936)	11
hs027561602	TGCGGTGACGGGTCTTGCCACGG (SEQ ID NO: 937)	11
hs027561588	GGCACAGCTGTACGAAGCCAGG (SEQ ID NO: 938)	11
hs027561460	CCCAGCTGCACTGCTGTACAGGG (SEQ ID NO: 939)	11
hs027561503	ATTCACCTGGGGGAGCCAAAGG (SEQ ID NO: 940)	11
hs027561483	CCAGGCCCTACTGGAGGAGGTGG (SEQ ID NO: 941)	11
hs027561462	TCAAGTGCTGGGACCCAGCCCGG (SEQ ID NO: 942)	11
hs027561504	GATTCACCTGGGGGAGCCAAAGG (SEQ ID NO: 943)	11
hs027561539	ACTAGGGTCCCGGGGCCGGGGGG (SEQ ID NO: 944)	11
hs027561621	GGGCTTCCTGGGTGTCCCTAAGG (SEQ ID NO: 945)	11
hs027561491	GGTTCCTTTGGCTCCCCCAGG (SEQ ID NO: 946)	11
hs027561448	TCCCATACTTTACCTGACTTCGG (SEQ ID NO: 947)	11
hs027561568	GTCCCCCTCCTAGGCCCCCTGGG (SEQ ID NO: 948)	11
hs027561609	CGGCGACTCCGTCTTGGTGAGGG (SEQ ID NO: 949)	11
hs027561624	TCAGGGCTGCATCTAGTTTAGGG (SEQ ID NO: 950)	11
hs027561487	GTAGGGCTGGTGAAGGTGTGGG (SEQ ID NO: 951)	11
hs027561403	TAGAGCTGACATCAAGCCAGAGG (SEQ ID NO: 952)	12
hs027561406	ATCTCATCGGAAGAGGAGGAAGG (SEQ ID NO: 953)	12
hs027561400	GTAATGCCATCACTTACCTCTGG (SEQ ID NO: 954)	12
hs027561401	GATGGCATTACAAGAATTAATGG (SEQ ID NO: 955)	12
hs027561379	GCTAGTGAACCTTCCCCCAGTGG (SEQ ID NO: 956)	13
hs027561373	GCAGCACCAACACTGATGAGCGG (SEQ ID NO: 957)	13
hs027561370	CTGATGAGCGGCCAGATGAGCGG (SEQ ID NO: 958)	13
hs027561383	AGAGAATCCATCAGATGGGGAGG (SEQ ID NO: 959)	13
hs027561358	GGATGACCTCTGAAGGAGGTGGG (SEQ ID NO: 960)	13
hs027561348	ACCAGGAACTTCTCAGAGAGCGG (SEQ ID NO: 961)	13
hs027561345	TTCTGGTGTGGAATGGGCAGGG (SEQ ID NO: 962)	13
hs027561346	CCAGGAACTTCTCAGAGAGCGGG (SEQ ID NO: 963)	13

hs027561356	CCAGGGATGACCTCTGAAGGAGG (SEQ ID NO: 964)	13
hs027561365	CCAGGGCTCAGAAATCCCCTGG (SEQ ID NO: 965)	13
hs027561359	TCTGAAGGAGGTGGGTCCAGTGG (SEQ ID NO: 966)	13
hs027561343	CTTCTCAGAGAGCGGGTGAGTGG (SEQ ID NO: 967)	13
hs027561364	ACTGGACCCACCTCCTTCAGAGG (SEQ ID NO: 968)	13
hs027561357	GGGATGACCTCTGAAGGAGGTGG (SEQ ID NO: 969)	13
hs027561360	CTGAAGGAGGTGGGTCCAGTGGG (SEQ ID NO: 970)	13
hs027561367	TCTGATGACATGTGCTCCAGGG (SEQ ID NO: 971)	13
hs027561369	ATCTGGCCGCTCATCAGTGTGG (SEQ ID NO: 972)	13
hs027561341	GAGAAGTTCTGGTGTGGAATGG (SEQ ID NO: 973)	13
hs027561378	CCCAGTGGCACACCTGAAGTTGG (SEQ ID NO: 974)	13
hs027561380	GTGCCTTCCTCCCCATCTGATGG (SEQ ID NO: 975)	13
hs027561374	CCAACTTCAGGTGTGCCACTGGG (SEQ ID NO: 976)	13
hs027561182	CAGGGACTTAAACAGCACCCCGG (SEQ ID NO: 977)	14
hs027561281	ACATAATCAACAGAAAGATGGGG (SEQ ID NO: 978)	14
hs027561199	AGCCCTGTCTTAAGGCCAGGGG (SEQ ID NO: 979)	14
hs027561184	TGGCTCAGGCTGAAGAACCGGGG (SEQ ID NO: 980)	14
hs027561284	CTATGTACAAGGAATACGAGTGG (SEQ ID NO: 981)	14
hs027561175	CAGGCACCAGGATAAAAGCAGGG (SEQ ID NO: 982)	14
hs027561270	TTATCAGGTGAATTGGTCAGGGG (SEQ ID NO: 983)	14
hs027561169	TATTTCAAGGTTTTTCACAGGGG (SEQ ID NO: 984)	14
hs027561299	TCTGAGTCCTCAGAATTGGGAGG (SEQ ID NO: 985)	14
hs027561247	ACAAGGCAATAGAAAAGCCAGGG (SEQ ID NO: 986)	14
hs027561264	GGCAGCTGTGGAAATGAATGAGG (SEQ ID NO: 987)	14
hs027561198	GCCCTGTCTTAAGGCCAGGGGG (SEQ ID NO: 988)	14
hs027561296	CCAACAGCGTTGATGCCTTGCGG (SEQ ID NO: 989)	14
hs027561286	AATACGAGTGGCTTTCATGGAGG (SEQ ID NO: 990)	14
hs027561289	GAGTGGCTTTCATGGAGGGAGGG (SEQ ID NO: 991)	14
hs027561242	CTTTATCCCCAAATAATAGGGGG (SEQ ID NO: 992)	14
hs027561252	GCTGAATATAAGGAATGGGGTGG (SEQ ID NO: 993)	14
hs027561257	CTTATATTCAGCAAGCAACAAGG (SEQ ID NO: 994)	14
hs027561300	CTGAGTCCTCAGAATTGGGAGGG (SEQ ID NO: 995)	14
hs027561272	AATTCACCTGATAAACTCTAGGG (SEQ ID NO: 996)	14
hs027561222	ACAGAAAAGTGCAGTCTAAGTGG (SEQ ID NO: 997)	14
hs027561168	ATATTTCAAGTTTTTCACAGGG (SEQ ID NO: 998)	14
hs027561170	TGAAATATAACACTCCATGCAGG (SEQ ID NO: 999)	14
hs027561277	CAGCCGTAAGTCAGGCTCGAGGG (SEQ ID NO: 1000)	14
hs027561243	TCTTTATCCCCAAATAATAGGGGG (SEQ ID NO: 1001)	14
hs027561219	TTACACATTTTGCCTTGGGAGG (SEQ ID NO: 1002)	14
hs027561287	ATACGAGTGGCTTTCATGGAGGG (SEQ ID NO: 1003)	14
hs027561171	TTTTTCACAGGGTTACAGTAGG (SEQ ID NO: 1004)	14

hs027561253	CTGAATATAAGGAATGGGGTGGG (SEQ ID NO: 1005)	14
hs027561274	TCTCCCTCGAGCCTGACTTACGG (SEQ ID NO: 1006)	14
hs027561200	AAGCCCTGTCTTAAGGCCAGGG (SEQ ID NO: 1007)	14
hs027561240	TATCCCCAAATAATAGGGGTGG (SEQ ID NO: 1008)	14
hs027561188	CAGTCTCCTAACCTCCCCCTGGG (SEQ ID NO: 1009)	14
hs027561174	TCAGGCACCAGGATAAAAAGCAGG (SEQ ID NO: 1010)	14
hs027561254	TGAATATAAGGAATGGGGTGGG (SEQ ID NO: 1011)	14
hs027561209	CCCCCTGAGGTTTCTCAGGTGG (SEQ ID NO: 1012)	14
hs027561276	CTCGAGCCTGACTTACGGCTGGG (SEQ ID NO: 1013)	14
hs027561294	GAGGGAAGCTGGGGGCCAAGG (SEQ ID NO: 1014)	14
hs027561250	GCTTGCTGAATATAAGGAATGGG (SEQ ID NO: 1015)	14
hs027561260	TGCCCTTAGCCACAGCTCTACGG (SEQ ID NO: 1016)	14
hs027561187	TCAGTCTCCTAACCTCCCCCTGG (SEQ ID NO: 1017)	14
hs027561165	CATGCAGGCCAGCTGTTGAGGG (SEQ ID NO: 1018)	14
hs027561194	TGGGCCTTAAGACAGGGCTTGGG (SEQ ID NO: 1019)	14
hs027561164	GCATGGAGTGTTATATTTCAAGG (SEQ ID NO: 1020)	14
hs027561275	CCTCGAGCCTGACTTACGGCTGG (SEQ ID NO: 1021)	14
hs027561197	GCTTGGGCAGAGAAGATAAATGG (SEQ ID NO: 1022)	14
hs027561244	TTCTTTATCCCCAAATAATAGGG (SEQ ID NO: 1023)	14

**Таблица 98: Экзонные сайты-мишени в Mar3K13 (LZK)**

SpCas9

<u>ID</u>	<u>последовательность</u>	<u>ЭКЗОН</u>
hs088398521	GGGAGCCTAGGATCCCCGACAGG (SEQ ID NO: 1024)	1
hs088398501	AGGAAGTTACGCACGGGAGGCCG (SEQ ID NO: 1025)	1
hs088398507	AGGCGGTACCTGGTTGTGGAGGG (SEQ ID NO: 1026)	1
hs088398520	CAGACGCTCCGCCCCACCCATGG (SEQ ID NO: 1027)	1
hs088398506	GAGGCGGTACCTGGTTGTGGAGG (SEQ ID NO: 1028)	1
hs088398508	GGTTGTGGAGGGTGACCCATGG (SEQ ID NO: 1029)	1
hs088398518	CGGAGCGTCTGGGATGCGCTGGG (SEQ ID NO: 1030)	1
hs088398513	GGGTGACGCCATGGGTGGGGCGG (SEQ ID NO: 1031)	1
hs088398512	GGAGGGTGACGCCATGGGTGGGG (SEQ ID NO: 1032)	1
hs088398712	ACTTCATTTAAAGAAACCCACGG (SEQ ID NO: 1033)	2
hs088398720	AAATCCTAGCACTCTGGGAGAGG (SEQ ID NO: 1034)	2
hs088398716	ACATGAGTCAATATGTATTGTGG (SEQ ID NO: 1035)	2
hs088403650	TCAGGGGAACAGCAACACGGTGG (SEQ ID NO: 1036)	3
hs088403645	ACACGATGAATCAGAGACGGCGG (SEQ ID NO: 1037)	3
hs088403619	AAGATGAGCTCACAGCTATGGGG (SEQ ID NO: 1038)	3
hs088403598	AAAACCTGAGAAAAACAGGAGGG (SEQ ID NO: 1039)	3
hs088403644	GGAACACGATGAATCAGAGACGG (SEQ ID NO: 1040)	3
hs088403599	CAAAACCTGAGAAAAACAGGAGG (SEQ ID NO: 1041)	3
hs088403649	GTCTCAGGGGAACAGCAACACGG (SEQ ID NO: 1042)	3

hs088403626	CGAGCAGCTTGGGAGAAAGGTGG (SEQ ID NO: 1043)	3
hs088403601	CAGAGTTCTGACTTAAGAGAGGG (SEQ ID NO: 1044)	3
hs088403625	TCGAGGACCAGCAGGAAAAGGGG (SEQ ID NO: 1045)	3
hs088403667	GATTACAAATTCAGCAGCAAGG (SEQ ID NO: 1046)	3
hs088403608	TGGTTATACTCATGGCACGATGG (SEQ ID NO: 1047)	3
hs088403602	ACAGAGTTCTGACTTAAGAGAGG (SEQ ID NO: 1048)	3
hs088403634	TCAACACTGTTGTGGTGACGGGG (SEQ ID NO: 1049)	3
hs088403633	AGTGTGACGAGCGTAAGTGAGG (SEQ ID NO: 1050)	3
hs088403652	GTGGACGGAGAGAGCACAAAGCGG (SEQ ID NO: 1051)	3
hs088403639	TACGCTCGTCAACACTGTTGTGG (SEQ ID NO: 1052)	3
hs088403638	GAGCGTAAGTGAGGATTCAGGG (SEQ ID NO: 1053)	3
hs088403641	GAACAGCGTTCTTCAGCTAAGGG (SEQ ID NO: 1054)	3
hs088403614	CTTTCACTGAAGGGTAAGTGTGG (SEQ ID NO: 1055)	3
hs088403651	GGGAACAGCAACACGGTGGACGG (SEQ ID NO: 1056)	3
hs088403655	CAGTTCAGCAGGTCAGGCAGTGG (SEQ ID NO: 1057)	3
hs088403610	GCTCAGGTGCTCCTGAAAGTTGG (SEQ ID NO: 1058)	3
hs088403622	CAAGCTGCTCGAGGACCAGCAGG (SEQ ID NO: 1059)	3
hs088403642	GCTGTTCTCAAACCTGGTCCCTGG (SEQ ID NO: 1060)	3
hs088403664	GGCCTGTATGGAATATCATTGGG (SEQ ID NO: 1061)	3
hs088403613	AGTGAAAGCAAACCTTCAATGG (SEQ ID NO: 1062)	3
hs088403623	GCTCGAGGACCAGCAGGAAAAGG (SEQ ID NO: 1063)	3
hs088403663	AGGCCTGTATGGAATATCATTGG (SEQ ID NO: 1064)	3
hs088403632	GTACCATCCCCTTTTCTGCTGG (SEQ ID NO: 1065)	3
hs088403659	GGCAGTGGTGGGTTTCTTGAAGG (SEQ ID NO: 1066)	3
hs088404068	CTTCTTGGGCAAGTTCCGGGCGG (SEQ ID NO: 1067)	4
hs088404063	GGGTAGTGGAGCCCAAGGAGCGG (SEQ ID NO: 1068)	4
hs088404074	AGTGAGAGAACAGAATGAGACGG (SEQ ID NO: 1069)	4
hs088404077	TAACATCATCGCATTCAAGTAGG (SEQ ID NO: 1070)	4
hs088404054	GCTTGTGTGCCTAGATACTTGGG (SEQ ID NO: 1071)	4
hs088404073	TGATGGCCACCTCTTCCGCCCGG (SEQ ID NO: 1072)	4
hs088404060	GAGCTGCAGTGGCTGGGTAGTGG (SEQ ID NO: 1073)	4
hs088404075	CTGTTCTCTCACTTTCTTGATGG (SEQ ID NO: 1074)	4
hs088404379	TGCCCATGGACAACCTCTACGAGG (SEQ ID NO: 1075)	5
hs088404376	CATGATAATACAATAACATGGGG (SEQ ID NO: 1076)	5
hs088404382	GACCTCGTAGAGTTGTCCATGGG (SEQ ID NO: 1077)	5
hs088404386	TGGTCCACAGGAATTGCAAGTGG (SEQ ID NO: 1078)	5
hs088404377	CCATGATAATACAATAACATGGG (SEQ ID NO: 1079)	5
hs088404378	TCCATGATAATACAATAACATGG (SEQ ID NO: 1080)	5
hs088404385	TTGCTAGTAGACTGGTCCACAGG (SEQ ID NO: 1081)	5
hs088404388	CATTCCACTTGCAATTCCTGTGG (SEQ ID NO: 1082)	5
hs088404381	ACGAGGTCTTACGAGCTGGCAGG (SEQ ID NO: 1083)	5

hs088404390	GATCACGATGAATAATTTTATGG (SEQ ID NO: 1084)	5
hs088404569	TTTAGTGACCCACACAGATGCGG (SEQ ID NO: 1085)	6
hs088404573	AAATTTTTACCGCATCTGTGTGG (SEQ ID NO: 1086)	6
hs088404579	GGTCGCATGGATGGCGCCAGAGG (SEQ ID NO: 1087)	6
hs088404576	CATTTGCTGGCACGGTCGCATGG (SEQ ID NO: 1088)	6
hs088404580	GGATGGCGCCAGAGGTGATACGG (SEQ ID NO: 1089)	6
hs088404581	GGTTCATTCCGTATCACCTCTGG (SEQ ID NO: 1090)	6
hs088404659	AAATCCTTATGAAACAGACGTGG (SEQ ID NO: 1091)	7
hs088404655	AAGTGAAGGAACTGGAAGGTGG (SEQ ID NO: 1092)	7
hs088404649	AAGAATCTACATCTTTGTAAGGG (SEQ ID NO: 1093)	7
hs088404658	AATCCATCAGGGCAAGTGAAGG (SEQ ID NO: 1094)	7
hs088404643	AAAAGACCTACAGTAGCGCCGGG (SEQ ID NO: 1095)	7
hs088404648	GATTCTTCAGCCATTATCTGGGG (SEQ ID NO: 1096)	7
hs088404639	CTACTGTAGGTCTTTTGGAGTGG (SEQ ID NO: 1097)	7
hs088404644	CAAAAAGACCTACAGTAGCGCCGG (SEQ ID NO: 1098)	7
hs088404657	TCAGGGCAAGTGAAGGAACTGG (SEQ ID NO: 1099)	7
hs088404662	ATAAGGATTTTGAATCCATCAGG (SEQ ID NO: 1100)	7
hs088404653	GTTCCCTTCCACTTGCCCTGATGG (SEQ ID NO: 1101)	7
hs088404652	GCTTCCAACACCCAGATAATGG (SEQ ID NO: 1102)	7
hs088404684	GTGTCTGCCGAAAAGAAGTCCGG (SEQ ID NO: 1103)	8
hs088404686	GGTGGCAAGTACATCTGCAGAGG (SEQ ID NO: 1104)	8
hs088404691	CTTGAAGTAAGTTTCTTGTGGGG (SEQ ID NO: 1105)	8
hs088404690	GAAGTAAGTTTCTTGTGGGGTGG (SEQ ID NO: 1106)	8
hs088404685	ATGAGTGTCTGCCGAAAAGAAGG (SEQ ID NO: 1107)	8
hs088404687	AGAAACTTACTTCAAGTCTCAGG (SEQ ID NO: 1108)	8
hs088404683	CGAAAAGAAGGTCCGTTTCGAGG (SEQ ID NO: 1109)	8
hs088404682	CTCGAAACCGACCTTCTTTTCGG (SEQ ID NO: 1110)	8
hs088405101	GTGAAGGAACTTGTATACACCGG (SEQ ID NO: 1111)	9
hs088405100	TTTGAGAAGATCAAAGTGAAGG (SEQ ID NO: 1112)	9
hs088405104	GAAGGCGCAGAGAAGAGCTCAGG (SEQ ID NO: 1113)	9
hs088405103	GAATCAGTTCTTCATCTAACCGG (SEQ ID NO: 1114)	9
hs088405096	TTGTCCTTACCCAGGCTGAATGG (SEQ ID NO: 1115)	9
hs088405099	CTTCTTCTCTCCATTACGCCTGG (SEQ ID NO: 1116)	9
hs088405182	TGCCTGTCAGAGAAAACACAGGG (SEQ ID NO: 1117)	10
hs088405184	ATATTCTGTGAACACTATGAGCGG (SEQ ID NO: 1118)	10
hs088405185	ACTATGAGCGGAAGCTTGAGCGG (SEQ ID NO: 1119)	10
hs088405188	TCATGCTGCAGCTAGAAATGCGG (SEQ ID NO: 1120)	10
hs088405187	GCGGGCGAATAATTTATACATGG (SEQ ID NO: 1121)	10
hs088405186	CTATGAGCGGAAGCTTGAGCGGG (SEQ ID NO: 1122)	10
hs088405191	CATTTCTAGCTGCAGCATGATGG (SEQ ID NO: 1123)	10
hs088405181	TTTCTCTGACAGGCATGCGCTGG (SEQ ID NO: 1124)	10

hs088405272	GATGGATGATAGGACGAACAGGG (SEQ ID NO: 1125)	11
hs088405265	CTGCAGGCGTGAGCAAGCAGTGG (SEQ ID NO: 1126)	11
hs088405271	TATCATCCATCCCAATGCCATGG (SEQ ID NO: 1127)	11
hs088405277	GTTTCTCCATGGCATTGGGATGG (SEQ ID NO: 1128)	11
hs088405276	GAGAAACTCATGAAAAGGAAAGG (SEQ ID NO: 1129)	11
hs088405283	AATCTGGGATGCAGACCAAACGG (SEQ ID NO: 1130)	11
hs088405274	CCATGGAGAAACTCATGAAAAGG (SEQ ID NO: 1131)	11
hs088405273	GGATGGATGATAGGACGAACAGG (SEQ ID NO: 1132)	11
hs088405280	CCTTTTCATGAGTTTCTCCATGG (SEQ ID NO: 1133)	11
hs088405266	TGCTCACGCCTGCAGAATAAAGG (SEQ ID NO: 1134)	11
hs088405558	CAGACTTGTTGAGATCAGAAGGG (SEQ ID NO: 1135)	12
hs088405679	ACGGAAGAAAATGAATTCAGCGG (SEQ ID NO: 1136)	12
hs088405620	CAACCTGCGCCAACAACCTGAGG (SEQ ID NO: 1137)	12
hs088405611	CATCCCAGACTCAATATGCACGG (SEQ ID NO: 1138)	12
hs088405643	AGAAGTTCTGAGCCTGACAAGGG (SEQ ID NO: 1139)	12
hs088405572	TTTGGGACTTCCGGACAAAGGGG (SEQ ID NO: 1140)	12
hs088405683	TGTAGGTCTGAGTCATCCCTCGG (SEQ ID NO: 1141)	12
hs088405585	TGCCTCTGCTATTCCCTCGGCGG (SEQ ID NO: 1142)	12
hs088405664	ATACCCTCTGCTGAGCCAGTGGG (SEQ ID NO: 1143)	12
hs088405582	CACCGCCGAGGGAATAGCAGAGG (SEQ ID NO: 1144)	12
hs088405687	CAGCGCTACCTCGAAAAACAAGG (SEQ ID NO: 1145)	12
hs088405618	TGTCCGTGCATATTGAGTCTGGG (SEQ ID NO: 1146)	12
hs088405657	AGTGCAGGCCAGAACAGTATGGG (SEQ ID NO: 1147)	12
hs088405630	CATGCTCAGAGACAGCTGCCCGG (SEQ ID NO: 1148)	12
hs088405579	AGCAAACCACGCCACCGCCGAGG (SEQ ID NO: 1149)	12
hs088405632	CTCTGAGCATGGTTGCTGAGTGG (SEQ ID NO: 1150)	12
hs088405603	AATTATGGTGATGAAGAGAAGGG (SEQ ID NO: 1151)	12
hs088405688	TGGAGGGGTGCCGAGATGAGAGG (SEQ ID NO: 1152)	12
hs088405628	GTTGCTGAGTGGGCTCCGCAGGG (SEQ ID NO: 1153)	12
hs088405580	GCAAACCACGCCACCGCCGAGGG (SEQ ID NO: 1154)	12
hs088405686	TGCCGAGATGAGAGGTGCCGAGG (SEQ ID NO: 1155)	12
hs088405592	GGGATGGGGTGAATTTTCTGAGG (SEQ ID NO: 1156)	12
hs088405685	GCCGAGATGAGAGGTGCCGAGGG (SEQ ID NO: 1157)	12
hs088405557	CCAGACTTGTTGAGATCAGAAGG (SEQ ID NO: 1158)	12
hs088405583	CTATTCCCTCGGCGGTGGCGTGG (SEQ ID NO: 1159)	12
hs088405636	GATGAGGTGAGGGCTCGAGCCGG (SEQ ID NO: 1160)	12
hs088405625	CTGCTGGGCCGAAATACCTCAGG (SEQ ID NO: 1161)	12
hs088405644	TCTCCAGCAGTCTGCAGCCATGG (SEQ ID NO: 1162)	12
hs088405586	GGCTGCCTCTGCTATTCCCTCGG (SEQ ID NO: 1163)	12
hs088405588	AGATTGCGGCAAAGTCACTATGG (SEQ ID NO: 1164)	12
hs088405613	GGGATGGTGACTCTGGGACATGG (SEQ ID NO: 1165)	12

hs088405599	ATTGGGATTGAGCTTGGTGCAGG (SEQ ID NO: 1166)	12
hs088405634	TGACCTCATCTCCACAGCCATGG (SEQ ID NO: 1167)	12
hs088405561	GATCTCAACAAGTCTGGCCTGGG (SEQ ID NO: 1168)	12
hs088405691	TTTTTCGAGGTAGCGCTGGAGGG (SEQ ID NO: 1169)	12
hs088405624	GCCGAAATACCTCAGGTTGTTGG (SEQ ID NO: 1170)	12
hs088405573	TTTTGGGACTTCCGGACAAAGGG (SEQ ID NO: 1171)	12
hs088405622	ATACCTCAGGTTGTTGGCGCAGG (SEQ ID NO: 1172)	12
hs088405659	TCTGGCCTGCACTGAAGGCAGGG (SEQ ID NO: 1173)	12
hs088405876	TTGAATTTCCACGAAGACAGAGG (SEQ ID NO: 1174)	13
hs088405869	TGGAGATGACTCCTCAGAAGAGG (SEQ ID NO: 1175)	13
hs088405870	TCTCCACTCTGAGGAGAACAAGG (SEQ ID NO: 1176)	13
hs088405875	TTCCCCTTCTTCTCTTCTGAGG (SEQ ID NO: 1177)	13
hs088406081	GAGACATCTGAGTCTTCACACGG (SEQ ID NO: 1178)	14
hs088406064	CGTCTAGCTTCTCTGCCAAGCGG (SEQ ID NO: 1179)	14
hs088406052	CAGCTGCTGATACAGCGATGGGG (SEQ ID NO: 1180)	14
hs088406061	ACTCATCAGGACTGTTTGAGTGG (SEQ ID NO: 1181)	14
hs088406051	GCCTAGAACCAAGAAGAACCAGG (SEQ ID NO: 1182)	14
hs088406066	CATTGACATATCCTCACACTCGG (SEQ ID NO: 1183)	14
hs088406078	CTGAGTCTTCACACGGCGCACGG (SEQ ID NO: 1184)	14
hs088406058	TCTGTGTCTGATGGAGAAGAGGG (SEQ ID NO: 1185)	14
hs088406070	ACATATCCTCACACTCGGATGGG (SEQ ID NO: 1186)	14
hs088406062	TGATAAACTTGAAGACCGCTTGG (SEQ ID NO: 1187)	14
hs088406084	GGAGGAACGTGGCTATGAGGTGG (SEQ ID NO: 1188)	14
hs088406073	GAGTGTGAGGATATGTCAATGGG (SEQ ID NO: 1189)	14
hs088406069	GACATATCCTCACACTCGGATGG (SEQ ID NO: 1190)	14
hs088406054	GGCAGCTGCTGATACAGCGATGG (SEQ ID NO: 1191)	14
hs088406074	CGAGTGTGAGGATATGTCAATGG (SEQ ID NO: 1192)	14
hs088406053	GCAGCTGCTGATACAGCGATGGG (SEQ ID NO: 1193)	14
hs088406317	ATGCAATCAGTAAAACCCAGAGG (SEQ ID NO: 1194)	15
hs088406249	GATCACTCAGTTCAGCTACGAGG (SEQ ID NO: 1195)	15
hs088406380	ATAAAGGTGGGAGAACAAGGGG (SEQ ID NO: 1196)	15
hs088406514	AGGATGCCAATGTTCCACAGTGG (SEQ ID NO: 1197)	15
hs088406420	AAAAACTGATCAAAAATTACGAGG (SEQ ID NO: 1198)	15
hs088406245	GAGAGGAAGAACATCTACAGTGG (SEQ ID NO: 1199)	15
hs088406591	AAATGCTCCAGGTTCCACAAGGG (SEQ ID NO: 1200)	15
hs088406375	ACGAATCCATGAGCCCTGTGCGG (SEQ ID NO: 1201)	15
hs088406360	TCCACTATTTGACATCCTGGGGG (SEQ ID NO: 1202)	15
hs088406675	GACAGTACAGGAGACCAGAGGGG (SEQ ID NO: 1203)	15
hs088406254	AACCTGGCTCCAGAGAGGGGTGG (SEQ ID NO: 1204)	15
hs088406677	CTGACAGTACAGGAGACCAGAGG (SEQ ID NO: 1205)	15
hs088406583	GACTGAACTAGGCTAAGCAGAGG (SEQ ID NO: 1206)	15

hs088406417	TCAAAAATTACGAGGTATCAGGGG (SEQ ID NO: 1207)	15
hs088406235	CCTGTAGGAACAAAGGTTGGGGG (SEQ ID NO: 1208)	15
hs088406341	CACAGCTAAGATCAATACCAGGG (SEQ ID NO: 1209)	15
hs088406409	GTGGCAACAGAGAAACATGAGGG (SEQ ID NO: 1210)	15
hs088406653	CTGAAGGTGAAGAGCCACTGGGG (SEQ ID NO: 1211)	15
hs088406690	CATTGCCGTTCAATACAGAGAGG (SEQ ID NO: 1212)	15
hs088406448	CAACACTCTTCAGATGACTGTGG (SEQ ID NO: 1213)	15
hs088406648	TCTTGCCCATATCACCCAGTGG (SEQ ID NO: 1214)	15
hs088406408	AGTGGCAACAGAGAAACATGAGG (SEQ ID NO: 1215)	15
hs088406329	AGAAGGTGTGATTTATGATGTGG (SEQ ID NO: 1216)	15
hs088406689	ATTGCCGTTCAATACAGAGAGGG (SEQ ID NO: 1217)	15
hs088406475	ACAGGTCTAAACTTAAGTGGTGG (SEQ ID NO: 1218)	15
hs088406247	TGGTGTTAGGAAAACGAACGTGG (SEQ ID NO: 1219)	15
hs088406565	AGTCTAAGAAGCAAGTAACTGGG (SEQ ID NO: 1220)	15
hs088406520	CAGTTCAGGAAGTTCAGTGGG (SEQ ID NO: 1221)	15
hs088406383	TCTCCTAGTGGAGAGTAGCAGGG (SEQ ID NO: 1222)	15
hs088406226	AGTATGAAAGATCAACACGTTGG (SEQ ID NO: 1223)	15
hs088406581	CTGAAAAGCCTATTCAGTCGG (SEQ ID NO: 1224)	15
hs088406229	GCCTGCTGACCACTTCTGTAGG (SEQ ID NO: 1225)	15
hs088406172	TATTGCAGCTCATTTCTAGGGGG (SEQ ID NO: 1226)	15
hs088406180	CATTTCAATCAAGAATGGCAGGG (SEQ ID NO: 1227)	15
hs088406307	AGAGTCCAGTGAATCTAGAGAGG (SEQ ID NO: 1228)	15
hs088406343	CTGTGTACAACAATCATCTGAGG (SEQ ID NO: 1229)	15
hs088406330	TGATTTATGATGTGGCACAATGG (SEQ ID NO: 1230)	15
hs088406223	TCAAGGTAGCACATTTGCCAAGG (SEQ ID NO: 1231)	15
hs088406664	ACTGTAATAAAGCGTCAAAGAGG (SEQ ID NO: 1232)	15
hs088406163	ACAAAATGCTGGGAGAGAGTGGG (SEQ ID NO: 1233)	15
hs088406288	GGGCTCTGAAAAGCATTCCAAGG (SEQ ID NO: 1234)	15
hs088406663	CTGTAATAAAGCGTCAAAGAGGG (SEQ ID NO: 1235)	15
hs088406210	CTTGCACCCAATGTCTTCAAGGG (SEQ ID NO: 1236)	15
hs088406605	GTCATGTGGCCAGGGTACGATGG (SEQ ID NO: 1237)	15
hs088406658	ACTTCCCAGACTCTGGAAGTGGG (SEQ ID NO: 1238)	15
hs088406615	TGCCGGGAGCTTCCCTTACAGTGG (SEQ ID NO: 1239)	15
hs088406236	CTGTAGGAACAAAGGTTGGGGGG (SEQ ID NO: 1240)	15
hs088406668	TTCATTCGCTCCAAGTCGATAGG (SEQ ID NO: 1241)	15
hs088406456	CATGGACATTCATCCCAAGATGG (SEQ ID NO: 1242)	15
hs088406282	TTTACATTGCCAAAAGCATGAGG (SEQ ID NO: 1243)	15
hs088406444	AGATTTTCCCGGTTATCACAAGG (SEQ ID NO: 1244)	15
hs088406389	TCTCCCTGCTACTCTCCACTAGG (SEQ ID NO: 1245)	15
hs088406189	CCCGGCCCAAAAATTCCCAAGG (SEQ ID NO: 1246)	15
hs088406230	ACCACTTCTGTAGGAACAAAGG (SEQ ID NO: 1247)	15

hs088406466	TAAAAGGAACTGTTATCCAGAGG (SEQ ID NO: 1248)	15
hs088406353	TGATCATGAAAAGCTCCTGGGTGG (SEQ ID NO: 1249)	15
hs088406579	TCTAATGTGCCAGTCTGTGAGGG (SEQ ID NO: 1250)	15
hs088406142	CCGATTCTTCAAACCTGCATGGGG (SEQ ID NO: 1251)	15
hs088406526	GCACACTCTACTGCAGAGCAGGG (SEQ ID NO: 1252)	15
hs088406354	GATCATGAAAGCTCCTGGGTGGG (SEQ ID NO: 1253)	15
hs088406609	AGAGCCCTAAGCAGATGGCAAGG (SEQ ID NO: 1254)	15
hs088406185	AACATCCTTGGGAATTTGTGGGG (SEQ ID NO: 1255)	15
hs088406314	ATCAGTAAAACCCAGAGGAGCGG (SEQ ID NO: 1256)	15
hs088406342	ACACAGCTAAGATCAATACCAGG (SEQ ID NO: 1257)	15
hs088406590	GAGCATTTCTCAGGGACAGGTGG (SEQ ID NO: 1258)	15
hs088406684	GGCTCCCTCTCTGTATTGAACGG (SEQ ID NO: 1259)	15
hs088406453	CTTGAAATCACAGTCTTGTGAGG (SEQ ID NO: 1260)	15
hs088406680	GAAAACAACACTGGGAGCTGGGG (SEQ ID NO: 1261)	15
hs088406513	GGATGCCAATGTTCCACAGTGGG (SEQ ID NO: 1262)	15
hs088406685	CCGGCATCAGAAAACAACACTGG (SEQ ID NO: 1263)	15
hs088406192	TATTATTGCTGCTTGAACAGGGG (SEQ ID NO: 1264)	15
hs088406392	ACTAAAGAACTTTAAGAAGGAGG (SEQ ID NO: 1265)	15
hs088406532	CTCGACTAGTGTCCACCTGTGG (SEQ ID NO: 1266)	15
hs088406214	GGCATGTGCTTCCCTTAGGAGGG (SEQ ID NO: 1267)	15
hs088406431	GAGAATAAGGTCCCTTAGTGGAGG (SEQ ID NO: 1268)	15
hs088406188	TGGGAATTTGTGGGGCCGGGAGG (SEQ ID NO: 1269)	15
hs088406654	TCTGAAGGTGAAGAGCCACTGGG (SEQ ID NO: 1270)	15
hs088406465	TTTAAAATTGCTTTGCAGAGGGG (SEQ ID NO: 1271)	15
hs088406213	GGGCATGTGCTTCCCTTAGGAGG (SEQ ID NO: 1272)	15
hs088406688	GTTCAATACAGAGAGGGAGCCGG (SEQ ID NO: 1273)	15
hs088406411	TCTCTGTTGCCACTAAAGGTGGG (SEQ ID NO: 1274)	15
hs088406608	AGAGCAGAGCCCTAAGCAGATGG (SEQ ID NO: 1275)	15
hs088406346	TGTTCTGCCCTGAAGCCCAATGG (SEQ ID NO: 1276)	15
hs088406295	CAAGGCACCATGAAGTACCTTGG (SEQ ID NO: 1277)	15
hs088406511	CAATGTTCCACAGTGGGAGAGGG (SEQ ID NO: 1278)	15
hs088406463	CTTTTAAAATTGCTTTGCAGAGG (SEQ ID NO: 1279)	15
hs088406539	CCACCTGTGGCTGTCCAGGGGCGG (SEQ ID NO: 1280)	15
hs088406626	GATCCCTGAGTGTGTGAAGTGG (SEQ ID NO: 1281)	15
hs088406339	ATACCAGGGAGCTCCCAAATGGG (SEQ ID NO: 1282)	15
hs088406521	TCAGTTCCAGGAAGTTCAAGTGG (SEQ ID NO: 1283)	15
hs088406352	ACTTGATCATGAAAGCTCCTGGG (SEQ ID NO: 1284)	15
hs088406357	CCAGGATGTCAAATAGTGGATGG (SEQ ID NO: 1285)	15
hs088406416	AATTACGAGGTATCAGGGGTAGG (SEQ ID NO: 1286)	15
hs088406665	AATTTGAGCTCCTATCGACTTGG (SEQ ID NO: 1287)	15
hs088406607	GAAGTCCCTGCCATCGTACCCTGG (SEQ ID NO: 1288)	15

hs088406266	GAGTTATTGAATAAAAAACAAAGG (SEQ ID NO: 1289)	15
hs088406391	AAGACTAAAGAACTTTAAGAAGG (SEQ ID NO: 1290)	15
hs088406173	TTATTGCAGCTCATTTCTAGGGG (SEQ ID NO: 1291)	15
hs088406683	CGGCATCAGAAAAACAACACTGGG (SEQ ID NO: 1292)	15
hs088406633	GGTCACTGGACAGCAGCCTAGGG (SEQ ID NO: 1293)	15
hs088406602	GGCTTTTGTAACTGTCATGTGG (SEQ ID NO: 1294)	15
hs088406277	AACATTTGTGAAAGAACAAGGG (SEQ ID NO: 1295)	15
hs088406281	GATGCTGAGCAGGGATAGGAAGG (SEQ ID NO: 1296)	15
hs088406402	CAGTGAGATCTGAAGTCAAGAGG (SEQ ID NO: 1297)	15
hs088406574	ACTGGTGGTGTGAGTATGCTAGG (SEQ ID NO: 1298)	15
hs088406443	TTTCCCGGTTATCACAAAGGCAGG (SEQ ID NO: 1299)	15
hs088406386	CTCCACTAGGAGAAATAAAGGTGG (SEQ ID NO: 1300)	15
hs088406552	ATTGTTGTCCAAAAGGGCAGTGG (SEQ ID NO: 1301)	15
hs088406256	AAGCAACCTGGCTCCAGAGAGGG (SEQ ID NO: 1302)	15
hs088406691	TATCAAAGCAAACAAATGCATGG (SEQ ID NO: 1303)	15
hs088406234	GAAGTGGTCAGCAGGCAGAAAGG (SEQ ID NO: 1304)	15
hs088406306	TCTTTGACACTGCATCATGTTGG (SEQ ID NO: 1305)	15
hs088406148	GCTCTGCTACCTGGTAATGAAGG (SEQ ID NO: 1306)	15
hs088406225	GTATGAAAGATCAACACGTTGGG (SEQ ID NO: 1307)	15
hs088406435	ATACCTTCTCTAGCCCAGCCTGG (SEQ ID NO: 1308)	15
hs088406259	ACTCAAGTAGACAAGCAACCTGG (SEQ ID NO: 1309)	15
hs088406555	GAAGGAACACCAATCACTGATGG (SEQ ID NO: 1310)	15
hs088406396	TCACTTAGAGGACCAACGACTGG (SEQ ID NO: 1312)	15
hs088406618	AGAGCCACTTCACAGCACTCAGG (SEQ ID NO: 1313)	15
hs088406538	TGTCCACCTGTGGCTGTCAGGGG (SEQ ID NO: 1314)	15
hs088406138	AACTGCATGGGGTTCTGCAAAGG (SEQ ID NO: 1315)	15
hs088406405	TTCTATCCAACATAAAAACACTGG (SEQ ID NO: 1316)	15
hs088406191	GTATTATTGCTGCTTGAACAGGG (SEQ ID NO: 1317)	15
hs088406251	GAACTGAGTGATCCTGAGAAATGG (SEQ ID NO: 1318)	15
hs088406506	CCCCCCCCAAAAAAGTCTGGG (SEQ ID NO: 1319)	15
hs088406140	CGGACTGTGACTCTTCAGATGGG (SEQ ID NO: 1320)	15
hs088406545	GTACCGCCCCGTGACAGCCACAGG (SEQ ID NO: 1321)	15
hs088406258	TGAGTCATATTGATTCAAGCAGG (SEQ ID NO: 1322)	15
hs088406546	AGTGGCCTTTCCCCTTTCTGTGG (SEQ ID NO: 1323)	15
hs088406305	AATCTAGAGAGGTTGTTTGACGG (SEQ ID NO: 1324)	15
hs088406284	TGAGGTCCTGCCTGTCTCCAGGG (SEQ ID NO: 1325)	15
hs088406676	TGACAGTACAGGAGACCAGAGGG (SEQ ID NO: 1326)	15
hs088406300	TCTGTCTTGGAGACAGGGACAGG (SEQ ID NO: 1327)	15
hs088406216	GCACATGCCCTTGAAGACATTGG (SEQ ID NO: 1328)	15
hs088406492	GCTTGGGTTTGGGATTTACCTGG (SEQ ID NO: 1329)	15
hs088406207	GGTCATTTCCGTAAGCCACCTGG (SEQ ID NO: 1330)	15

hs088406393	AGAACTTTAAGAAGGAGGCCTGG (SEQ ID NO: 1331)	15
hs088406573	AGTGTCCCACCCTCACAGACTGG (SEQ ID NO: 1332)	15
hs088406250	GTTCAGCTACGAGGAGAAGATGG (SEQ ID NO: 1333)	15
hs088406512	CCAATGTTCCACAGTGGGAGAGG (SEQ ID NO: 1334)	15
hs088406464	TTTTAAAATTGCTTTCAGAGGG (SEQ ID NO: 1335)	15
hs088406509	CCTCTCCCACTGTGGAACATTGG (SEQ ID NO: 1336)	15
hs088406450	ACTGTTGTAACACACTTGTCAAG (SEQ ID NO: 1337)	15
hs088406260	AGCAGGAGAACAGACTTTGAAGG (SEQ ID NO: 1338)	15
hs088406139	TCGGACTIONGACTCTTCAGATGG (SEQ ID NO: 1339)	15
hs088406165	CTCTTCCCAGACAAAATGCTGGG (SEQ ID NO: 1340)	15
hs088406433	TCCTTAGTGGAGGTTAAAAAGGG (SEQ ID NO: 1341)	15
hs088406202	CTTCAACCAGCTTGTCCAGGTGG (SEQ ID NO: 1342)	15
hs088406338	ATTCCCATTTGGGAGCTCCCTGG (SEQ ID NO: 1343)	15
hs088406144	GTCCGATTCTTCAAACACTGCATGG (SEQ ID NO: 1344)	15
hs088406644	TAGCTTGCACATGCTGGCTGGGG (SEQ ID NO: 1345)	15
hs088406640	CCTTGGCCTGCAGTCACTGGAGG (SEQ ID NO: 1346)	15
hs088406476	CAAACAGGTCTAAACTTAAGTGG (SEQ ID NO: 1347)	15
hs088406472	AGACCTGTTTGCAAGATGGTGGG (SEQ ID NO: 1348)	15
hs088406377	TCCCACCTTTATTCTCCTAGTGG (SEQ ID NO: 1349)	15
hs088406292	CTTTTCAGAGCCCATGACCCTGG (SEQ ID NO: 1350)	15
hs088406423	TAAGTGTATGAGTATGTTAGGG (SEQ ID NO: 1351)	15
hs088406359	TTTGACATCCTGGGGTCAATCGG (SEQ ID NO: 1352)	15
hs088406321	AAATGGATCAAACAAGCAAAGG (SEQ ID NO: 1353)	15
hs088406177	CTGAACATTTCAATCAAGAATGG (SEQ ID NO: 1354)	15
hs088406562	TTTCTGTTTATAAAAAGGTGAGGG (SEQ ID NO: 1355)	15
hs088406594	CAGGGACAGGTGGCTAAAGAGGG (SEQ ID NO: 1356)	15
hs088406553	ATTGGAATTGTTGTCCAAAAGGG (SEQ ID NO: 1357)	15
hs088406470	GTTTAGACCTGTTTGCAAGATGG (SEQ ID NO: 1358)	15
hs088406557	GAATGGGATCCATCAGTGATTGG (SEQ ID NO: 1359)	15
hs088406231	CTTCTGTAGGAACAAAGGTTGG (SEQ ID NO: 1360)	15
hs088406145	AGTGTCTGATGCCACAGTTAGG (SEQ ID NO: 1361)	15
hs088406243	CAGTACTGAGGAGGAGAAAAGGG (SEQ ID NO: 1362)	15
hs088406390	TCTAGGATGACATCACAGTTAGG (SEQ ID NO: 1363)	15
hs088406687	TCTCTGTATTGAACGGCAATGGG (SEQ ID NO: 1364)	15
hs088406340	AATACCAGGGAGCTCCCAAATGG (SEQ ID NO: 1365)	15
hs088406567	TTTCGAGACTTTGACTTGTACGG (SEQ ID NO: 1366)	15
hs088406328	CTCATTTTCTGTGATCAGAAGG (SEQ ID NO: 1367)	15
hs088406227	GGAAATGAGCTACAAGGAAATGG (SEQ ID NO: 1368)	15
hs088406540	TCAGGGGCGGTACCACAGAAAGG (SEQ ID NO: 1369)	15
hs088406686	CTCTCTGTATTGAACGGCAATGG (SEQ ID NO: 1370)	15
hs088406582	TATTCAAGTCGGACTIONGACTAGG (SEQ ID NO: 1371)	15

hs088406221	GACAGTGACAGCACTAAAAAGGG (SEQ ID NO: 1372)	15
hs088406171	TGCAGCTCATTTCTAGGGGGTGG (SEQ ID NO: 1373)	15
hs088406493	GCACATCTATTATTTAGAAAAGG (SEQ ID NO: 1374)	15
hs088406387	ACTCTCCACTAGGAGAATAAAGG (SEQ ID NO: 1375)	15
hs088406242	GCAGTACTGAGGAGGAGAAAAGG (SEQ ID NO: 1376)	15
hs088406414	TATCTTACATCTTTCAGTGATGG (SEQ ID NO: 1377)	15
hs088406382	AATAAAGGTGGGAGACAAAGGG (SEQ ID NO: 1378)	15
hs088406159	AGAGAGTGGGATGAGTCTGGGGG (SEQ ID NO: 1379)	15
hs088406679	CCAGTGTGTTTTCTGATGCCGG (SEQ ID NO: 1380)	15
hs088406241	CCCCAACCTTTGTTCTACAGG (SEQ ID NO: 1381)	15
hs088406164	GACAAAATGCTGGGAGAGATGG (SEQ ID NO: 1382)	15
hs088406174	GTTATTGCAGCTCATTTCTAGGG (SEQ ID NO: 1383)	15
hs088406519	AGTGGGACTGTTTTAAGAAAAGG (SEQ ID NO: 1384)	15
hs088406486	TCTAAATAATAGATGTGCTTGGG (SEQ ID NO: 1385)	15
hs088406395	AAGGAGGCCCTGGTCACTTAGAGG (SEQ ID NO: 1386)	15
hs088406642	GCCAGCATGTGCAAGCTATTAGG (SEQ ID NO: 1387)	15
hs088406429	AGAGGTTTCAGAGGAGAATAAGG (SEQ ID NO: 1388)	15
hs088406482	AAAATGTCTTTACTTCTAGAAGG (SEQ ID NO: 1389)	15
hs088406437	GCTGCCTGCCTTGTGATAACCGG (SEQ ID NO: 1390)	15
hs088406646	AATAGCTTGCACATGCTGGCTGG (SEQ ID NO: 1391)	15
hs088406534	GAGCCTGTCGTTCTGCCATTGGG (SEQ ID NO: 1392)	15
hs088406556	GTGATTGGTGTTCCTTCAATTGG (SEQ ID NO: 1393)	15
hs088406503	CTTTTTTTGGGGGGGGTGAGGG (SEQ ID NO: 1394)	15
hs088406516	AGTAAATCATTTGATCAAAAAGG (SEQ ID NO: 1395)	15
hs088406158	GAGTGGGATGAGTCTGGGGGTGG (SEQ ID NO: 1396)	15
hs088406313	ACTGATTGCATCAGCCAAAAAGG (SEQ ID NO: 1397)	15

*Последовательность конструкции*

**saCas9\_4x-gRNA (hs07571799 [Sa] ;hs07571796 [Sa] ;**

**hs07571783 [Sa] ; hs07571778 [Sa])**

CCATGGGCGCATGCAAATTACGCGCTGTGCTTTGTGGGAAATCACCCCTAAACGAAAAAT  
TTATTCCTCTTTTCGAGCCTTATAGTGGCGGCCGGTCTACATCCTGAAGATCATTTCTGTGGCAG  
TAAGGTTTTAGTACTCTGGAAACAGAATCTACTAAAACAAGGCAAAATGCCGTGTTTATCTCGT  
CAACTTGTTGGCGAGATTTTTTGTAAACGCGCATGCAAATTACGCGCTGTGCTTTGTGGGAAAT  
CACCCCTAAACGAAAAATTTATTCCTCTTTTCGAGCCTTATAGTGGCGGCCGGTCTACATCCTGAA  
TCAAAAGCTACCGGTTACCTGGTTTTAGTACTCTGGAAACAGAATCTACTAAAACAAGGCAAAA  
TGCCGTGTTTATCTCGTCAACTTGTTGGCGAGATTTTTTTCTAGACACACAAAAACCAACACA  
CAGATGTAATGAAAATAAAGATATTTTATTAGGCTGATCAGCGAGCTCTAGGAATCCTTAGGAT  
CCCTTTTTCTTTTTTGCCTGGCCGGCCTTTTTTCGTGGCCGCCGGCCTTTTTGCCCTTTTTGATGA  
TCTGAGGGTGCTTCTTAGATTTCACTTCATACAGGTTGCCCAGAATGTCTGTGCTGTACTTCTT

AATGCTCTGGGTCTTGGAGGCGATTGTCTTAATGATCCTGGGGGGCCTCTTGTCGTTTCATGTTT  
TCCAGGTACTCGCGGTAGGTGATGTCGATCATGTTCACTTCGATCCGGTTCAGCAGGTCGTTGT  
TCACGCCGATCACTCTATACAGCTCGCCGTTGATCTTGATCAGATCGTTGTTGTAGAAGGAGGC  
GATAAACTCGGCCTGGTTGCTGATCTTCTTCAGCTTCTTAGCTTCCTCATAGCACTTGCTATTC  
ACTTCGTAGTAGTTTTCTTTTTTGATCACATCCAGATTCTTCACGGTCACGAACTTGTACACGC  
CATTGTCCAGGTACACGTCGAATCTGTAGGGCTTCAGGGACAGCTTCACGACCTTGTTTCTGCT  
GTTGGGGTAGTCGTCGGTGATGTCCAGATGGGCGTTCAGTTTGTGGCCGTAATACTTAATCTTC  
TTGATCACGGGGCCGTTGTCCTTTTTGGAGTACTTGGTCAGGTAGTCCCGGTTTCCTCGTAGT  
ACTTGTACAGGGGATTCTTCTCGTCGCCGTACTGTTCCATAATCAGCTTCAGTTTCTGGTAGGT  
CTGGGGGTCGTGGTGGTACATCAGCAGCTTTTCGGGGCTCTTGTTGATCAGCTTTTTTCAGCTTG  
TCATTGTCCTTGTCGTACAGGCCGTTTCAGATTGTTTCACGATCAGGGTGTGGCCCTTGTCGTCCT  
TCCGGGTGGAGTACAGGGTGTCTTAATCAGCTCTCTATTAGGCTTCTTGTCACCCGGTGGCT  
GTACTTGTAGTCCTTGAAGTCTTAATGTGCTTGATCTGGTGGGGGGTGATGAAGATCTCTTTG  
TACTCCTGCTCGGTTTTCGATCTCGGGCATGCTCTCGGCCTGCTTTTCTCGAACATCTGGTTTT  
CCATCACTTTTTTGGCCTTGTCAGTTTCTTCCACTCTTTGAAGATGAAATCGGCCTTGGCAAT  
GATCAGGGCGTCTCGGCCTGGTGTGTTACCCTTGTTCCGCTCTTTCTTAAACTTCCACTTC  
CGCCGCAGAAAGCTGGTGAAGCCGCCATTGATGGACTTCACTTTCACGTCCAGGTTGTTCACTC  
TGAAGTAGCTCCGCAGCAGGTTTCATCAGGCCTCTGGTGGCGTATCTGGTATCCACCAGGTTCCG  
GTTGATGAAGTCTTTCTGCACGGAGAACCCTGTTGATGTCCCGTTCCTCCAGCAGATACTCTTTC  
TTGGTCTTGCTGATTCTGCCCTTGCCCTTGCCAGATTTCAGGATGTGCTTCTTGAAGGTTTCGT  
AGCTGATCTTGCTGTCGCTGCTGCTCAGGTACTGGAATGGGGTCCGGTTGCCCTTCTTGCTGTT  
TTCTTCTGCTTCACGAGCACCTTGTTGTTGAAGCTGTTGTGCAAGGACACGCTTCTGGGGATG  
ATGTGGTCCACCTCATAGTTGAAGGGGTTGTTTCAGCAGATCTTCCAGAGGGATGGCTTCCAGGC  
TGTACAGGCACTTGCCCTTCTGCATGTCGTGCAGCTTGATCTTCTCGATCAGGTACTTGGCGTT  
CTCTTTGCCGGTGGTCCGGATGATTTCTCGATCCGCTCGTTGGTCTGCCGGTTCGCTTCTGC  
ATCTCGTTGATCATTTTTCTGGGCGTCCCTGGAGTTCTTCTCGCGGGCCAGCTCGATAATGATGT  
CGTTGGGCAGGCCGTACTTCTTGATGATGGCGTTGATCACTTTGATGCTCTGGATGAAGCTTCT  
CTTCACGACGGGGCTCAGGATGAAGTCGTCCACCAGGGTGGTGGGGATCTCTTTCTGCTGGGAC  
AGGTCCACCTTCTTGGGCACCAGCTTCAGCCGGTTGAAGATAGCGATCTGGTTGTCGTTGGTGT  
GCCACAGCTCGTCCAGGATCAGGTTGATGGCCTTCAGGCTCAGGTTGTGGGTGCCGGTATAGCC  
CTTCAGATTAGAGATCTGCTCGATCTTCTTCCCTGGGTCAGCTCGGAGTTCAGATTGGTCAGTTCT  
TCCTGGATGTCTCGCTGCTCTGGTAGATGGTCAGGATCTTGGCAATCTGATCCAGCAGCTCGG  
CGTTCTCAATAATCTCTTTCCGGGCGGTAATGTCCTTGATGTCGTGGTACACCTTCAGGTTGGT  
GAACTCGGGCTTGCCGGTGGTGGTCACTCTGTAGCCCTTAATATCCTCTTCGTTTCACGAGGATT  
TCTTTGGCGATCTGCTTCAGGGTGGGCTTCTTCTTCTGCTTGAACACGTTCTCGATGATCTGGA  
ACTTCTCGTAATATTCCAGCTTCTCGTTCCTGGTGGTATCACGAGATTGTTTCAGGTCGTT

CAGGGCGTTGTACAGGTCGGCGTTGTAGGCGTACTTCACGCTCCGCAGTTCCTCGGGGAAGTAG  
 GTGCAGTGGCCCATCAGCATCTCGTACCATTCTTTGATGTCCTTCCAGCCGAAGGGGCTGCCCT  
 CGCCAGGTCCTCATAGTAGGTCCGCCGGGTTTCCAGCAGGTCGATGTAGGTGTCGATGAAGCT  
 CTGGTCCAGCTGGTGGTAGGCCTTCTGCACCTTCAGCAGCTGTTTGGCTTCTTTCACGTAGTCG  
 CTGGTCTTGAATCTGTTGATGCTGCCCCGCACTTCGCCGTCTTCTTCCAGCCGTTCCAGCTGCA  
 GTTCGGCCACGTATTTCTTCCAGGGCCTTGCTGTTCCGGCTGATCTGCTCTTTGGTGGACAG  
 CTCGTTGCCGGTGTCTCTTCCACCTCGTTCACGTTGTGCACGCCTTCTCTTGGCCAGGTGC  
 AGCAGGGCGGCAGAGAACTCTTCCCTCGCTCAGCTTCTGGCTCAGGCCCTTCACTCTGGCCTCGT  
 AGGGGTTGATGCCGCTCAGCTCGCTGTGGTCGGTCAGCAGGTTGTAGTCGAACAGCAGCTTCTT  
 CACTCTCTGGATTCTATGCCGCCTCCGCCGCTTCAGCCTTCTGGCGCCTCTCTTGCTCCGCCTG  
 CCTCGTTGTTTTCCACGTTGGCCTCTTTGAACAGCCGCACGCCGGCATCGATCACGTCCCGTG  
 TCTCGTAGTCGATGATGCCGTAGCCCACGCTGGTGTGATGCCGATGTCCAGGCCCAGGATGTAGTT  
 CCGCTTGGCTGCTGGGACTCCGTGGATACCGACCTTCCGCTTCTTCTTTGGGGCCATGTGGCGG  
 CTCTTGAAGGACGACGTCATCATCCCTTGCCCGGATGCGCGGGCTTCTTGTCTAGCACAGGAGC  
 CTGGGGTAGAGCGCATGCAAATTACGCGCTGTGCTTTGTGGGAAATCACCTAAACGAAAAATT  
 TATTCCTCTTTCGAGCCTTATAGTGGCGGCCGGTCTACATCCTGAAGATCTTATTCTACTCCTG  
 TGAGTTTTAGTACTCTGAAACAGAATCTACTAAAACAAGGCAAATGCCGTGTTTATCTCGTC  
 AACTTGTGGCGAGATTTTTTGTATATCGCGCATGCAAATTACGCGCTGTGCTTTGTGGGAAATC  
 ACCCTAAACGAAAAATTTATTCCTCTTTCGAGCCTTATAGTGGCGGCCGGTCTACATCCTGAAA  
 ACGTTGTTCTGAGTAGCTTTGTTTTAGTACTCTGAAACAGAATCTACTAAAACAAGGCAAAT  
 GCCGTGTTTATCTCGTCAACTTGTGGCGAGATTTTTTCTCGAGGCGGCCGC (SEQ ID  
 NO:110)

**Самокомплементарные AAV векторы**

**pscAAV\_DLK (mm079)**

AAAGCTTCCCAGGGGGATCTGGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGG  
 CCGGGCGACCAAAGGTCGCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGC  
 GCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTCTTGAGGGGTGGAGTCGTGACCTAG  
 GCGGCCCGCTAAGATACATTGATGAGTTTGGACAAACCACAACCTAGAATGCAGTGAAAAAATG  
 CTTTATTTGTGAAATTTGTGATGCTATTGCTTTATTTGTAACCATTATAAGCTGCAATAAACAA  
 GTTAACAACAACAATTGCATTCATTTTATGTTTCAGGTTTCAGGGGGAGGTGTGGGAGGTTTTTT  
 AAAGCAAGTAAACCTCTACAAATGTGGTATGGCTGATTATGATCAGTTATCTAGATTTACTTA  
 TGTAGCTCGTCCATGCCGCCGGTGGAGTGGCGGCCCTCGGCGCGTTCGTAAGTTCCACGATGG  
 TGTAGTCCCTCGTTGTGGGAGGTGATGTCCAACCTGATGTTGACGTTGTAGGCGCCGGGCAGCTG  
 CACGGGCTTCTTGGCCTTGTAGGTGGTCTTGACCTCAGCGTCGTAGTGGCCGCCGTCCTTCAGC  
 TTCAGCCTCTGCTTGTGATCTCGCCCTTCAGGGCGCCGTCCTCGGGGTACATCCGCTCGGAGGAGG  
 CCTCCCAGCCCATGGTCTTCTTCTGCATTACGGGGCCGTCGGAGGGGAAGTTGGTGGCCGCGCAG

CTTCACCTTGTAGATGAACTCGCCGTCCTGCAGGGAGGAGTCCTGGGTCACGGTCACCACGCCG  
CCGTCCTCGAAGTTCATCACGCGCTCCCACTTGAAGCCCTCGGGGAAGGACAGCTTCAAGTAGT  
CGGGGATGTCGGCGGGGTGCTTACGTAGGCCCTGGAGCCGTACATGAACTGAGGGGACAGGAT  
GTCCCAGGCGAAGGGCAGGGGGCCACCCTTGGTCACCTTACGCTTGGCGGTCTGGGTGCCCTCG  
TAGGGGCGGCCCTCGCCCTCGCCCTCGATCTCGAACTCGTGGCCGTTACGGAGCCCTCCATGT  
GCACCTTGAAGCGCATGAACTCCTTGATGATGGCCATGTTATCCTCCTCGCCCTTGCTCACCAT  
GGTGGCGACCGGTGGATCCTTAGAGCTAGTGTACTTGGTAACTGCCTTAGTGCCCTCGGACACA  
GCATGCTTAGCCAGCTCCCCAGGCAGCAGCAGGCGCACAGCCGTCTGAATCTCCCTGGAGGTGA  
TGGTCGAGCGCTTATTGTAGTGAGCCAGGCGAGAAGCCTCGCCCGCATGCGCTCGAAGATGTC  
GTTGACGAAGGAGTTCATGATCCCCATGGCCTTGGATGAGATGCCGGTGTGGGGTGGACCTGC  
TTCAGAACCTTGTACACATAGATAGAATAGCTCTCCTTGGCGGTGCGCTTACGCTTCTTACCAT  
CCTTCTTCTGCGCCTTAGTGATAGCCTTCTTAGAACCCCTTTTTAGGGGCTGGAGCAGACTTAGA  
GGGTTACGGCATGGTGGCGGCCGCTCTTGAAGGACGACGTCATCATCCCTTGCCCGGATGCGCG  
GGCTTCTTGTCTAGCACAGGAGCCTGGGGTAGAGCGCATGCAAATTACGCGCTGTGCTTTGTGG  
GAAATCACCCCTAAACGAAAAATTTATTCCTCTTTCGAGCCTTATAGTGGCGGCCGGTCTACATC  
CTGAAGAAGAAGGTTTCGAGATCTCAGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGT  
CCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCCTTTTTTCTAGACCCAGCTTTCTTGTA  
CAAAGTTGGCGGCCGCACTAGTCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGC  
GACCAAAGGTCGCCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAG  
AGAGGGACAGATCCGGGCCCGCATGCGTCGACAATCACTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTGA  
CTGGGAAAACCCTGGCGTTACCCAACTTAATCGCCTTGCAGCACATCCCCCTTTCGCCAGCTGG  
CGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAAT  
GGCGCCTGATGCGGTATTTTCTCCTTACGCATCTGTGCGGTATTTACACCGCATATGGTGCAC  
TCTCAGTACAATCTGCTCTGATGCCGCATAGTTAAGCCAGCCCCGACACCCGCCAACACCCGCT  
GACGCGCCCTGACGGGCTTGTCTGCTCCCGGCATCCGCTTACAGACAAGCTGTGACCGTCTCCG  
GGAGCTGCATGTGTCAGAGGTTTTACCGTCATCACCGAAACGCGCGAGACGAAAGGGCCTCGT  
GATACGCCTATTTTTATAGGTTAATGTCATGATAATAATGGTTTTCTTAGACGTGAGGTGGCACT  
TTTCGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTATC  
CGCTCATGAGACAATAACCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTATGAGTAT  
TCAACATTTCCGTGTCGCCCTTATTCCCTTTTTTGCGGCATTTTGCCTTCTGTTTTTGCTCAC  
CCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTACATCG  
AACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTCCAATGAT  
GAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTATTGACGCCGGGCAAGAGCAA  
CTCGGTGCGCCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTCACCAGTCACAGAAAAGC  
ATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAACAC  
TGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGACAAAC

ATGGGGGATCATGTAACCTCGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACG  
 ACGAGCGTGACACCACGATGCCTGTAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACCTATTAACCTGGCGA  
 ACTACTTACTCTAGCTTCCCCGGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGA  
 CCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGC  
 GTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTAT  
 CTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCC  
 TCACTGATTAAGCATTGGTAACGTGTCAGACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAA  
 AACTTCATTTTTAATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTTGATAATCTCATGACCAAAT  
 CCCTTAACGTGAGTTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCT  
 TGAGATCCTTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAACACCAGCTACCAGCGG  
 TGGTTTGTTTGCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAACCTGGCTTCAGCAGAGC  
 GCAGATAACAAATACTGTTCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCCTCAAGAACTCTGTA  
 GCACCGCCTACATACTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGT  
 CGTGTCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTTCGGGCTGAAC  
 GGGGGTTTCGTGCACACAGCCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAG  
 CGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCG  
 GCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAG  
 TCCTGTTCGGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGCGG  
 AGCCTATGAAAAACGCCAGCAACGCGGCCTTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGCTGGCCTTTTG  
 CTCACATGTTCTTTCCTGCGTTATCCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTG  
 AGCTGATACCGCTCGCCGCAGCCGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAA  
 GAGCGCCCAATACGCAAACCGCCTCTCCCCGCGCGTTGGCCGATTCAATTAATGCAGCTGGCACG  
 ACAGGTTTCCCGACTGGAAAGCGGGCAGTGAGCGCAACGCAATTAATGTGAGTTAGCTCACTCA  
 TTAGGCACCCAGGCTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGGAATTGTGAGCGGA  
 TAACAATTTACACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGCCAAGCTCTCGAGATCTAG (SEQ  
 ID NO:1398)

**pscAAV\_LZK (GFP)**

AAAGCTTCCCGGGGGGATCTGGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGG  
 CCGGGCGACCAAAGGTCGCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGC  
 GCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACCTCCATCACTAGGGGTTCCTGGAGGGGTGGAGTCGTGACCTAG  
 GGCGGCCGCTAAGATAACATTGATGAGTTTGGACAAACCACAACCTAGAATGCAGTGAAAAAATG  
 CTTTATTTGTGAAATTTGTGATGCTATTGCTTTATTTGTAACCATTATAAGCTGCAATAAACAA  
 GTTAACAACAACAATTGCATTCATTTTATGTTTCAGGTTTCAGGGGGAGGTGTGGGAGGTTTTTT  
 AAAGCAAGTAAAACCTCTACAAATGTGGTATGGCTGATTATGATCAGTTATCTAGATTTACTTG  
 TACAGCTCGTCCATGCCGAGAGTGATCCCGGCGGCGGTCACGAACTCCAGCAGGACCATGTGAT  
 CGCGCTTCTCGTTGGGGTCTTTGCTCAGGGCGGACTGGGTGCTCAGGTAGTGGTTGTTCGGGCAG

CAGCACGGGGCCGTCGCCGATGGGGGTGTTCTGCTGGTAGTGGTCGGCGAGCTGCACGCTGCCG  
TCCTCGATGTTGTGGCGGATCTTGAAGTTCACCTTGATGCCGTTCTTCTGCTTGTGGCCATGA  
TATAGACGTTGTGGCTGTTGTAGTTGTACTCCAGCTTGTGCCCCAGGATGTTGCCGTCCTCCTT  
GAAGTCGATGCCCTTCAGCTCGATGCGGTTACCAGGGTGTGCGCCTCGAACTTCACCTCGGCG  
CGGGTCTTGTAGTTGCCGTCGTCCTTGAAGAAGATGGTGCCTCCTGGACGTAGCCTTCGGGCA  
TGGCGGACTTGAAGAAGTCGTGCTGCTTCATGTGGTCGGGGTAGCGGCTGAAGCACTGCACGCC  
GTAGGTCAGGGTGGTCACGAGGGTGGGCCAGGGCACGGGCAGCTTGCCGGTGGTGCAGATGAAC  
TTCAGGGTCAGCTTGCCGTAGGTGGCATCGCCCTCGCCCTCGCCGGACACGCTGAACTTGTGGC  
CGTTTACGTCGCCGTCCAGCTCGACCAGGATGGGCACCACCCCGGTGAACAGCTCCTCGCCCTT  
GCTCACCATGGTGGCGACCGGTGGATCCTTAGAGCTAGTGTACTTGGTAACTGCCTTAGTGCC  
TCGGACACAGCATGCTTAGCCAGCTCCCCAGGCAGCAGCAGGGCGCACAGCCGTCTGAATCTCCC  
TGGAGGTGATGGTCGAGCGCTTATTGTAGTGAGCCAGGCGAGAAGCCTCGCCCGCGATGCGCTC  
GAAGATGTCGTTGACGAAGGAGTTCATGATCCCCATGGCCTTGATGAGATGCCGGTGTGCGGG  
TGGACCTGCTTCAGAACCTTGTACACATAGATAGAATAGCTCTCCTTGCGGCTGCGCTTACGCT  
TCTTACCATCCTTCTTCTGCGCCTTAGTGATAGCCTTCTTAGAACCTTTTTAGGGGCTGGAGC  
AGACTTAGAGGGTTCAGGCATGGTGGCGGCCGCTCTTGAAGGACGACGTCATCATCCCTTGCCC  
GGATGCGCGGGCTTCTTGTCTAGCACAGGAGCCTGGGGTAGAGCGCATGCAAATTACGCGCTGT  
GCTTTGTGGGAAATCACCTAAACGAAAAATTTATTCCTCTTTCGAGCCTTATAGTGGCGGCCG  
GTCTACATCCTGAAGCCGACACCCCAAATGATGGGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAAT  
AAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGTCTTTTTTCTAGACCCAGC  
TTTTCTTGTACAAAGTTGGCGGCCGCACTAGTCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTG  
AGGCCGGGCGACCAAAGTTCGCCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCG  
AGCGCGCAGAGAGGGACAGATCCGGGCCCGCATGCGTCGACAATTCACTGGCCGTGTTTTACA  
ACGTCGTGACTGGGAAAACCTGGCGTTACCCAACTTAATCGCCTTGCAGCACATCCCCCTTTC  
GCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCAACAGTTGCGCAGCCTGA  
ATGGCGAATGGCGCCTGATGCGGTATTTTCTCCTTACGCATCTGTGCGGTATTTACACCCGCAT  
ATGGTGCCTCTCAGTACAATCTGCTCTGATGCCGCATAGTTAAGCCAGCCCCGACACCCGCCA  
ACACCCGCTGACGCGCCCTGACGGGCTTGTCTGCTCCCGGCATCCGCTTACAGACAAGCTGTGA  
CCGTCTCCGGGAGCTGCATGTGTGTCAGAGTTTTACCGTTCATCACCAGAACGCGGAGACGAAA  
GGCCTCGTGATACGCCTATTTTTATAGGTTAATGTCATGATAATAATGGTTTTCTTAGACGTCA  
GGTGGCACTTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTATTTTTCTAAATACATTCAA  
ATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAG  
TATGAGTATTCAACATTTCCGTGTGCGCCTTATTCCCTTTTTTGCGGCATTTTGCCTTCTGTT  
TTTGCTCACCCAGAAACGCTGGTGAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGG  
GTTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCCCCGAAGAAGCTTT  
TCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTATTGACGCCGGG

CAAGAGCAACTCGGTGCGCCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTCACCAGTCA  
CAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGCTGCCATAACCATGAG  
TGATAACACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTT  
TTGCACAACATGGGGGATCATGTAACCTCGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCA  
TACCAAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGTAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACCTATT  
AACTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAA  
GTTGCAGGACCCTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTGGAG  
CCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTAT  
CGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAG  
ATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAACTGTCAGACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGA  
TTGATTTAAACTTCATTTTTTAATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTTGATAATCTCAT  
GACCAAATCCCTTAACGTGAGTTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAA  
GGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAACCCCGC  
TACCAGCGGTGGTTTGTGGCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAACCTGGCTT  
CAGCAGAGCGCAGATACCAAATACTGTTCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAG  
AACTCTGTAGCACCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTG  
GCGATAAGTCGTGTCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTC  
GGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGA  
TACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGCGGACAGGTATC  
CGGTAAGCGGCAGGGTTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGAAACGCCTGGTA  
TCTTTATAGTCTGTGCGGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCA  
GGGGGGCGGAGCCTATGAAAAACGCCAGCAACGCGGCCTTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGCT  
GGCCTTTTGCTCACATGTTCTTCTGCGTTATCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGC  
CTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGACGCCGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAG  
GAAGCGGAAGAGCGCCCAATACGCAAACCGCCTCTCCCCGCGGTTGGCCGATTCATTAATGCA  
GCTGGCACGACAGGTTTTCCCGACTGGAAAGCGGGCAGTGAGCGCAACGCAATTAATGTGAGTTA  
GCTCACTCATTAGGCACCCAGGCTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGGAATT  
GTGAGCGGATAACAATTTACACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGCCAAGCTCTCGAGAT  
CTAG (SEQ ID NO:1399)

**pscAAV\_dual (DLK+LZK)**

AAAGCTTCCCGGGGGGATCTGGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGG  
CCGGGCGACCAAAGGTCGCCGACGCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGC  
GCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTCTGGAGGGGTGGAGTCGTGACCTAG  
GGCGGCCCGCTGCAATATTTGCATGTCGCTATGTGTTCTGGGAAATCACCATAAACGTGAAATG  
TCTTTGGATTTGGGAGTCTTATAAGTTCTGTATGAGACCACTTTTTCCCGCCGACACCCCAAAT  
GATGGGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAG

TGGCACCGAGTCGGTGCTTTTTTTAAGATACATTGATGAGTTTGGACAAACCACAAC TAGAATG  
CAGTGAAAAAATGCTTTATTTGTGAAATTTGTGATGCTATTGCTTTATTTGTAACCATTATAA  
GCTGCAATAAACAAGTTAACAACAACAATTGCATTCATTTTATGTTTCAGGTT CAGGGGAGGT  
GTGGGAGGTTTTTTAAAGCAAGTAAACCTCTACAAATGTGGTATGGCTGATTATGATCAGTTA  
TCTAGATTTACTTATGTAGCTCGTCCATGCCGCCGGTGGAGTGGCGGCCCTCGGCGCGTTCGTA  
CTGTTCCACGATGGTGTAGTCCCTCGTTGTGGGAGGTGATGTC CAACTTGATGTTGACGTTGTAG  
GCGCCGGGCAGCTGCACGGGCTTCTTGGCCTTGTAGGTGGTCTTGACCTCAGCGTCGTAGTGGC  
CGCCGTCC TTCAGCTTCAGCCTCTGCTTGATCTCGCCCTTCAGGGCGCCGTCCCTCGGGGTACAT  
CCGCTCGGAGGAGGCCTCCCAGCCCATGGTCTTCTTCTGCATTACGGGGCCGT CGGAGGGGAAG  
TTGGTGCCGCGCAGCTTCACCTTGTAGATGAACTCGCCGTCTGCAGGGAGGAGTCTGGGTCA  
CGGTCACCACGCCGCCGTCCCTCGAAGTTCATCACGCGCTCCC ACTTGAAGCCCTCGGGGAAGGA  
CAGCTTCAAGTAGTCGGGGATGTCGGCGGGGTGCTT CACGTAGGCCTTGGAGCCGTACATGAAC  
TGAGGGGACAGGATGTCCCAGGCGAAGGGCAGGGGGCCACCCTTGGTCACCTTCAGCTTGGCGG  
TCTGGGTGCCCTCGTAGGGGCGGCCCTCGCCCTCGCCCTCGATCTCGAACTCGTGGCCGTT CAC  
GGAGCCCTCCATGTGCACCTTGAAGCGCATGAACTCCTTGATGATGGCCATGTTATCCTCCTCG  
CCCTTGCTCACCATGGTGGCGACCGGTGGATCCTTAGAGCTAGTGTACTTGGTAACTGCCTTAG  
TGCCCTCGGACACAGCATGCTTAGCCAGCTCCCCAGGCAGCAGCAGGCGCACAGCCGTCTGAAT  
CTCCCTGGAGGTGATGGTCGAGCGCTTATTGTAGTGAGCCAGGCGAGAAGCCTCGCCCCGCGATG  
CGCTCGAAGATGTCGTTGACGAAGGAGTTCATGATCCCCATGGCCTTGGATGAGATGCCGGTGT  
CGGGGTGGACCTGCTTCAGAACCTTGTACACATAGATAGAATAGCTCTCCTTGCGGCTGCGCTT  
ACGCTTCTTACCATCCTTCTTCTGCGCCTTAGTGATAGCCTTCTTAGAACCTTTTTTAGGGGCT  
GGAGCAGACTTAGAGGGTTCAGGCATGGTGGCGGCCGCTCTTGAAGGACGACGTCATCATCCCT  
TGCCCGGATGCGCGGGCTTCTTGTCTAGCACAGGAGCCTGGGGTAGAGCGCATGCAAATTACGC  
GCTGTGCTTTGTGGGAAATCACCTAAACGAAAAATTTATTCCTCTTTTCGAGCCTTATAGTGGC  
GGCCGGTCTACATCCTGAAGAAGAAGGTTTCGAGATCTCAGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTT  
AAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCTTTTTTTCTAGAC  
CCAGCTTTCTTGTACAAAGTTGGCGGCCGCACTAGTCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCT  
CACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGC  
GAGCGAGCGCGCAGAGAGGGACAGATCCGGGCCCGCATGCGTCGACAATTCACTGGCCGTCGTT  
TTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCCTGGCGTTACCCA ACTTAATCGCCTTGCAGCACATCCCC  
CTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAG  
CCTGAATGGCGAATGGCGCCTGATGCGGTATTTTCTCCTTACGCATCTGTGCGGTATTTACAC  
CGCATATGGTGC ACTCTCAGTACAATCTGCTCTGATGCCGCATAGTTAAGCCAGCCCCGACACC  
CGCCAACACCCGCTGACGCGCCCTGACGGGCTTGTCTGCTCCCGGCATCCGCTTACAGACAAGC  
TGTGACCGTCTCCGGGAGCTGCATGTGTCAGAGGTTTT CACCGTCATCACCGAAACGCGCGAGA  
CGAAAGGGCCTCGTGATACGCCATTTTTTATAGGTTAATGTCATGATAATAATGGTTTCTTAGA

CGTCAGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTATTTTTCTAAATACA  
TTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGG  
AAGAGTATGAGTATTCAACATTTCCGTGTCGCCCTTATTCCCTTTTTTGCGGCATTTCCTTC  
CTGTTTTTGTCTACCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACG  
AGTGGGTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCCCCGAAGAA  
CGTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTATTGACG  
CCGGGCAAGAGCAACTCGGTCGCCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTCACC  
AGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGCTGCCATAACC  
ATGAGTGATAACACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCG  
CTTTTTTGCACAACATGGGGGATCATGTAACCTCGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGA  
AGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGTAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAA  
CTATTAAGTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGG  
ATAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTTATTGCTGATAAATC  
TGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCC  
CGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCG  
CTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAACTGTCAGACCAAGTTTACTCATATATACT  
TTAGATTGATTTAAAACCTTCATTTTTAATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTTGATAAT  
CTCATGACCAAAATCCCTTAACGTGAGTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGA  
TCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAACCC  
ACCGCTACCAGCGGTGGTTTTGTTTGCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAACCT  
GGCTTCAGCAGAGCGCAGATAACCAAATACTGTTCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACT  
TCAAGAACTCTGTAGCACCGCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGC  
CAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAG  
CGGTCCGGCTGAACGGGGGGTTCTGTGCACACAGCCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAAC  
TGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAG  
GTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAACGCC  
TGGTATCTTTATAGTCCTGTGCGGTTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCT  
CGTCAGGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGCCAGCAACGCGGCCTTTTTACGGTTCCTGGCCTT  
TTGCTGGCCTTTTGCTCACATGTTCTTTCCTGCGTTATCCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATT  
ACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGACGCCGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGA  
GCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCCAATACGCAAACCGCCTCTCCCCGCGCGTTGGCCGATTCATTA  
ATGCAGCTGGCACGACAGGTTTTCCCGACTGGAAAGCGGGCAGTGAGCGCAACGCAATTAATGTG  
AGTTAGCTCACTCATTAGGCACCCCAGGCTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTG  
GAATTGTGAGCGGATAACAATTTACACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGCCAAGCTCTC  
GAGATCTAG (SEQ ID NO:1400)

**Пример 2**

Здесь представлен основанный на AAV подход к лечению LCA. В отличие от способов лечения, связанных с переносом генов, в этом подходе используется технология редактирования генома с помощью CRISPR. CRISPR была разработана в последние годы и очень быстро революционизировала биологические исследования и открыла новую эру для генетической медицины (4, 5). Системы CRISPR состоят из бактериальной эндонуклеазы и короткой РНК, которая направляет эту нуклеазу в специфический сайт расщепления в геноме. С помощью адаптированной к конкретным применениям РНК-проводника (gRNA) CRISPR может быть запрограммирована на разрушение любого гена или регуляторного элемента человека или на делецию и замену последовательностей геномной ДНК с высокой степенью специфичности. Основанный на CRISPR подход к LCA будет способствовать постоянному удалению мутации из клеток, подверженных риску дегенерации, и, таким образом, излечит заболевание.

Существует одно серьезное техническое препятствие для использования AAV для применений CRISPR - их размер. AAV представляют собой небольшие вирусы, которые могут упаковывать до 5,2 т.о. ДНК. Стандартная CRISPR значительно превышает эту пакующую емкость. CRISPR состоят из бактериальной эндонуклеазы Cas9 и по меньшей мере одной gRNA. Наиболее часто используемый белок Cas9, из *S. pyogenes*, кодируется одним геном размером 4,1 т.о. Невозможно упаковать оба компонента CRISPR - с использованием стандартных промоторов и последовательностей терминаторов, необходимыми для экспрессии - в один вирус.

В W02015195621, которая включена сюда посредством ссылки, раскрыто решение проблемы пакующей емкости. В основе этого нового подхода к доставке CRISPR лежит компактный двунаправленный промотор, известный как H1. Один промотор H1 может эффективно экспрессировать как Cas9, так и gRNA. Этот уникальный генетический элемент позволяет упаковать сборку, состоящую из любого гена Cas9 и множества gRNA, оптимально четырех, в один рекомбинантный AAV (фиг. 1), называемый AAV-H1-CRISPR. Способность к добавлению gRNA позволяет AAV-H1-CRISPR создавать двухцепочечные разрывы со специфичностью в отношении

места неспаривания, минимизируя таким образом общеизвестный риск мутагенеза вне мишени (6, 7).

Здесь представлено безопасное и долговременное лечение LCA10 с помощью индивидуально вводимого терапевтического средства AAV-H1-CRISPR. LCA10 вызывается мутациями в гене CEP290. Этот подтип LCA поражает приблизительно 2000 индивидуумов в западном мире. Это терапевтическое средство контрастирует с современной технологией, разрабатываемой Editas Medicine. Их решение проблемы пакующей емкости заключается в использовании меньшего гена Cas9. Однако их векторная конфигурация может поражать меньше геномных мишеней, чем таковая авторов настоящего изобретения, и у нее отсутствует важная особенность: использование четырех gRNA для обеспечения большей точности нацеливания (как упомянуто выше), которая, как было показано, предотвращает мутагенез вне мишени, который является значительной проблемой безопасности (6, 7). У AAV-H1-CRISPR сохраняется эта важная особенность. Ожидается, что частота мутаций вне мишени, вызванных вектором для LCA10, будет незначительной.

1. Сборка вирусной конструкции. С целью облегчения быстрой сборки вирусных векторов из модульных компонентов в условиях коммерческой лаборатории, будут синтезированы модульные кассеты, которые будут многократно использоваться для последующих целей. Вектор для LCA10 будет собран из этих общих модулей и четырех CEP290-специфичных модулей H1-gRNA. Окончательная сборка будет подтверждена с помощью рестрикционного картирования, а затем с помощью полного секвенирования. Конечный продукт будет предоставляться в виде собранной вирусной конструкции из 1 мг трансфекционной CEP290-специфической AAV челночной ДНК-плазмиды, не содержащей эндотоксинов и ошибок в последовательности.

2. Подготовка и анализ запаса AAV-H1-CRISPR. Упаковка вирусной конструкции, очистка вирусных частиц и молекулярная оценка титра, степени чистоты и инфективности вируса будут выполняться сертифицированной в соответствии с cGMP (текущими правилами организации производства и контроля качества

лекарственных средств) центральной лабораторией, в соответствии с отраслевыми стандартами (10). Продукция вирусного запаса, который качественно и количественно подходит для доклинических испытаний. Подготовленный и очищенный в соответствии с cGMP запас стерильного AAV, не содержащего эндотоксинов, с минимальной инфективностью 0,9 ME/вирусный геном, с минимальным титром  $10^{12}$  вирусных геномов/мл и минимальным выходом  $10^{14}$  инфекционных единиц.

3. Количественная характеристика геномных мишеней AAV-H1-CRISPR и сайтов вне мишени. Функциональная валидация будет проводиться с использованием иммортализованной линии клеток пигментного эпителия сетчатки hTERT-RPE1, которая содержит сайты-мишени в случае LCA10. Сайты на мишени и предсказанные сайты вне мишени в популяции инфицированных клеток будут глубоко секвенированы. Соотношение модифицированная аллель/немодифицированная аллель обеспечит количественный показатель эффективности; соотношение модификаций в мишени/вне мишени будет окончательным показателем специфичности. Вирусы будут проверены *in vivo* с использованием образцов биопсии от созданных человеком мышей и человека. Количественный анализ контактирования с мишенью. Вирус, который может вызывать делецию в >5% аллелей CEP290 в культуре (считается, что пороговая величина, составляющая 5%, приводит к улучшению зрения *in vivo*), с <0,1% нецелевых эффектов.

1. Maguire AM et al. *N Engl J Med*. 2008; 358(21): 2240-2248.
  2. Schimmer J et al. *Hum Gene Ther Clin Dev*. 2015; 26(4): 208-210.
  3. Azvolinsky A. *Nat Biotechnol*. 2015; 33(7): 678-678.
  4. Barrangou R. *Science*. 2014; 344(6185): 707-708.
  5. Barrangou R et al. *Expert Opin Biol Ther*. 2015; 15(3): 311-314.
  6. Shen B et al. *Nat Methods*. 2014; 11(4): 399-402.
  7. Church G. *Nature*. 2015; 528(7580): S7.
  8. Philippidis A. *Hum Gene Ther Clin Dev*. 2015; 26(2): 1-4.
- Summarized in a recent press report:  
<http://www.reuters.com/article/us-sparktherapeutics-study->

idUKKCN0RZ0WX20151005

9. Touchot N, Flume M. *Nat Biotechnol*. 2015; 33(9): 902-904.
10. Wright JF. *Gene Ther*. 2008; 15(11): 840-848.

### Пример 3

Здесь представлен альтернативный подход к лечению ADRP благодаря разработке технологии редактирования генов с помощью CRISPR/Cas9 (Doudna, J.A et al. *Science* 346, 1258096 (2014); Hsu, PD., et al. *Cell* 157, 1262-1278 (2014)), в случае которой направляемая РНК эндонуклеаза используется в сочетании с адаптированными к конкретным применениям небольшими РНК-проводниками (gRNA) для нацеливания и расщепления мутантной аллели родопсина, которая из-за подверженного ошибкам негомологичного присоединения конца (NHEJ) будет специфически выключать экспрессию мутантной аллели, не влияя на нормальный аллель. Хотя этот подход может привести к экспрессии только 50% от уровня родопсина дикого типа, полученные на животных данные говорят о том, что этого должно быть достаточно для обеспечения клинически полезной функции палочек (Liang, Y. et al. *The Journal of biological chemistry* 279: 48189-48196 (2004)).

Мутации R135 в родопсине приводят к наиболее агрессивной и быстро прогрессирующей форме пигментного ретинита (RP). Пораженные индивидуумы имеют ночную слепоту в детстве с потерей поля зрения до второго десятилетия жизни. Прогрессирование заболевания необычно высокое, со средней потерей в 50% в год базовой амплитуды ЭРГ и площади поля зрения. К четвертому десятилетию жизни функция желтого пятна серьезно нарушена (OMIM: <http://www.omim.org/entry/180380>).

По некоторым оценкам, мутации R135 являются вторыми по распространенности мутациями родопсина в мире. Мутации R135 особенно поддаются корректированию с помощью NHEJ, так как преждевременные стоп-кодоны, вероятно, приводят к деградации транскриптов за счет нонсенс-опосредованной деградации, ослабляя доминантно-негативный эффект этой мутации. Самая распространенная мутация, R347, встречается в экзоне 5 родопсина, что создает дополнительные проблемы для корректирования с помощью редактирования генома с использованием

CRISPR. Преждевременные стоп-кодоны в последнем экзоне гена не подвержены нонсенс-опосредованной деградации.

1. Audo I *et al.* *Invest Ophthalmol Vis Sci.* (2010) Jul; 51(7):3687-700.

2. Pannarale MR *et al.* *Ophthalmology.* (1996) Sep; 103(9):1443-52.

3. Andréasson S *et al.* *Ophthalmic Paediatr Genet.* (1992) Sep; 13(3):145-53.

*Сайты-мишени для CRISPR*

**Нацеливание на последовательность дикого типа (WT):**

hs086172474: CCTGGCCATCGAGCGGTACGTGG (SEQ ID NO:111)

hs086172476: GGCCATCGAGCGGTACGTGGTGG (SEQ ID NO:112)

hs086172479: CCACGTACCGCTCGATGGCCAGG (SEQ ID NO:113)

hs086172480: CACCACCACGTACCGCTCGATGG (SEQ ID NO: 114)

**Нацеливание на R135G:**

hs086172474: CCTGGCCATCGAGGGGTACGTGG (SEQ ID NO:115)

hs086172476: GGCCATCGAGGGGTACGTGGTGG (SEQ ID NO:116)

hs086172479: CCACGTACCCCTCGATGGCCAGG (SEQ ID NO:117)

hs086172480: CACCACCACGTACCCCTCGATGG (SEQ ID NO:118)

**Нацеливание на R135W:**

hs086172474: CCTGGCCATCGAGTGGTACGTGG (SEQ ID NO:119)

hs086172476: GGCCATCGAGTGGTACGTGGTGG (SEQ ID NO:120)

hs086172479: CCACGTACCACTCGATGGCCAGG (SEQ ID NO:121)

hs086172480: CACCACCACGTACCACTCGATGG (SEQ ID NO:122)

**Нацеливание на R135L:**

hs086172474: CCTGGCCATCGAGCTGTACGTGG (SEQ ID NO:123)

hs086172476: GGCCATCGAGCTGTACGTGGTGG (SEQ ID NO:124)

hs086172479: CCACGTACAGCTCGATGGCCAGG (SEQ ID NO:125)

hs086172480: CACCACCACGTACAGCTCGATGG (SEQ ID NO:126)

**Последовательности gRNA:**

**WT**

hs086172474: CCTGGCCATCGAGCGGTACGGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAA  
AATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCTTTT (SEQ ID  
NO:127)

hs086172476: GGCCATCGAGCGGTACGTGGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAA  
AATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCTTTT (SEQ ID

NO:128)

hs086172479:CCACGTACCGCTCGATGGCCGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAA  
AATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCTTTT (SEQ ID  
NO:129)

hs086172480:CACCACCACGTACCGCTCGAGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAA  
AATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCTTTT (SEQ ID  
NO:130)

### R135G

hs086172474:CCTGGCCATCGAGGGGTACGGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAA  
AATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCTTTT (SEQ ID  
NO:131)

hs086172476:GGCCATCGAGGGGTACGTGGGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAA  
AATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCTTTT (SEQ ID  
NO:132)

hs086172479:CCACGTACCCCTCGATGGCCGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAA  
AATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCTTTT (SEQ ID  
NO:133)

hs086172480:CACCACCACGTACCCCTCGAGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAA  
AATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCTTTT (SEQ ID  
NO:134)

### R135W

hs086172474:CCTGGCCATCGAGTGGTACGGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAA  
AATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCTTTT (SEQ ID  
NO: 135)

hs086172476:GGCCATCGAGTGGTACGTGGGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAA  
AATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCTTTT (SEQ ID  
NO:136)

hs086172479:CCACGTACCACTCGATGGCCGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAA  
AATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCTTTT (SEQ ID  
NO: 137)

hs086172480:CACCACCACGTACCACTCGAGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAA  
AATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCTTTT (SEQ ID  
NO:138)

### R135L

hs086172474:CCTGGCCATCGAGCTGTACGGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAA  
AATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCTTTT (SEQ ID

NO:139)

hs086172476:GGCCATCGAGCTGTACGTGGGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAA  
AATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCTTTT (SEQ ID  
NO:140)

hs086172479:CCACGTACAGCTCGATGGCCGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAA  
AATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCTTTT (SEQ ID  
NO:141)

hs086172480:CACCACCACGTACAGCTCGAGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAA  
AATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCTTTT (SEQ ID  
NO:142)

#### **Пример 4**

Глаукома, ведущая причина необратимой слепоты во всем мире (1), представляет собой нейропатию зрительного нерва, при которой прогрессирующее повреждение аксонов ганглиозных клеток сетчатки (RGC) в решетчатой пластине головки зрительного нерва приводит к дегенерации аксонов и гибели клеток (2). В настоящее время единственное лечение, будь то глазные капли, лазеры или хирургическое вмешательство, заключается в снижении внутриглазного давления (ВГД) и уменьшении повреждения головки зрительного нерва. К сожалению, это трудно для некоторых пациентов, тогда как у других пациентов болезнь может продолжать ухудшаться, несмотря на активное снижение ВГД. В этой области уже давно нужна альтернативная терапевтическая стратегия, которая могла бы дополнить снижение ВГД путем ослабления ответной реакции RGC на остаточное повреждение аксонов. Более того, NEI включил регенерацию зрительного нерва в число своих инновационных целей, и любая регенеративная терапия обязательно должна решать проблему выживаемости аксотомизированных RGC. В связи с этим существует огромная потребность в разработке нейропротективного средства, которое могло бы непосредственно вмешиваться в активные генетические программы дегенерации аксонов RGC и/или гибели клеток, связанной с повреждением аксонов (3-6).

С целью идентификации, всесторонним и непредвзятым образом, генов, которые могли бы служить новыми мишенями лекарственных средств для нейропротективной терапии глаукомы, весь мышинный

кином (поддающаяся лечению подсовокупность генома) был подвергнут скринингу на наличие киназ, ингибирование которых способствует выживаемости RGC. Для этого скрининга был разработан высокопроизводительный метод для подавления экспрессии генов в первичных RGC от самцов и самок мышей C57B1/6 (7), с использованием коротких интерферирующих РНК-олигонуклеотидов (siRNA), и он был сочетан с количественным анализом выживаемости RGC (CellTiter-Glo, Promega) (5). Используя этот подход, ранжированная библиотека из 1869 siRNA, нацеленных на 623 киназы, была подвергнута скринингу в отношении способности к увеличению выживаемости RGC через три дня после иммунопэннинга (который обязательно аксотомизирует клетки). Двумя наилучшими результатами скрининга были киназа с двойной лейциновой застежкой-молнией (DLK/MAP3K12) и ее единственный известный субстрат, митоген-активируемая протеинкиназа 7 (MKK7). Используя самцов и самок мышей Dlk (8) и инъекции в стекловидное тело Cre-экспрессирующего аденоассоциированного вируса (AAV2) с модифицированным капсидом (9, 10), было установлено, что целенаправленное разрушение Dlk делает RGC в высокой степени устойчивыми к индуцируемой повреждением аксонов гибели клеток в модели раздавливания зрительного нерва на мышши (5). Более того, поскольку JUN N-концевые киназы (JNK) 1-3, обычно активируемые с помощью одной или более вышерасположенных (в пути передачи сигналов) MAP3K, как было показано, играют центральную роль в гибели клеток RGC (11, 12), было исследовано, является ли DLK (MAP3K12) пусковым сигналом сверху в пути передачи. В самом деле, в то время как мышши дикого типа, в стекловидное тело которых инъецировали AAV2-Cre, отвечали на повреждение зрительного нерва сильной активацией передачи сигналов от JNK в соме и аксоне RGC, у мышшей с Dlk, фланкированным loxP-сайтами, была снижена активация этого пути (5). Наконец, используя опубликованные данные профилирования ингибиторов киназ (13, 14), ингибитор протеинкиназы тозасертиб был идентифицирован как ингибитор DLK, и было установлено, что он защищает RGC как в модели рассечения зрительного нерва крысы, так и в модели глаукомы (5). В некоторых вариантах осуществления

последовательности-мишени для DLK/MAP3K12 могут включать нуклеотидную последовательность, выбираемую из группы, состоящей из SEQ ID NO:788-1023.

Было замечено, что тозасертиб всякий раз увеличивал выживаемость RGC *in vitro* больше, чем только нокдаун или нокаут DLK (5). Это говорит о том, что одна или более дополнительных киназных мишеней тозасертиба (которых более 150) могут взаимодействовать с DLK для активации гибели клеток, и что одновременное ингибирование и того и другого должно способствовать максимальной выживаемости RGC. С целью идентификации этих других мишеней, скрининг кинома был модифицирован с включением siRNA, нацеленной на Dlk, в каждую лунку, и была увеличена его чувствительность к тем siRNA библиотеки, которые проявляли синергизм с нокдауном DLK для дальнейшего увеличения выживаемости RGC (фиг. 19А). Другая модификация состояла в предоставлении 48 часов для существующего белкового обмена, прежде чем усугубить повреждение во время иммунопэннинга колхицином, дестабилизатором микротрубочек, который использовался для моделирования повреждения аксонов *in vitro* и *in vivo* (15, 16). Как и ожидалось, поскольку siRNA, нацеленная на Dlk, уже присутствовала повсюду, ни один из олигонуклеотидов в виде siRNA, нацеленных на Dlk, из библиотеки (которые были наиболее эффективны при начальном скрининге кинома) не улучшал выживаемость выше исходного уровня. Вместо этого находящимся на первом месте геном в этом модифицированном протоколе «синергизма» была близкородственная киназа смешанного происхождения, киназа с лейциновой застежкой-молнией (LZK/MAP3K13). Четыре дополнительные siRNA, нацеленные на Lzk, с последовательностями, не использованными при первоначальном скрининге, подтвердили, что нокдаун LZK (фиг. 19В, вставка) сам по себе имел небольшое действие, но был очень синергетическим вместе с нокдауном DLK в стимулировании выживаемости первичных RGC (фиг. 1В). Более того, этот синергизм был специфическим для LZK, поскольку ни один из других членов семейства киназ смешанного происхождения (т.е. MLK1-3) не оказывал никакого эффекта на выживаемость (не представленные данные). Поскольку

тозасертиб ингибирует LZK, в дополнение к DLK (13, 14), рассмотрели, действительно ли LZK является «другой» основной мишенью. В соответствии с этой гипотезой, индивидуальный нокаун или LZK, или DLK был частично нейропротективным и сенсibilизировал клетки к низким дозам тозасертиба (как и следовало ожидать, если бы основная мишень лекарственного средства уже была генетически разрушена). Более того, совместный нокаун как DLK, так и LZK повторил выживаемость, вызванную лекарственным средством, и дальнейшее добавление тозасертиба не дало эффекта (как можно было бы ожидать, если бы все основные мишени лекарственного средства уже были генетически разрушены) (фиг. 19C). В некоторых вариантах осуществления последовательности-мишени для DLK/MAP3K13 могут включать нуклеотидные последовательности, выбираемые из группы, состоящей из SEQ ID NO:1024-1397.

Хотя доказательства того, что LZK является основным медиатором гибели клеток RGC, были существенными, они были полностью основаны на отдельных siRNA. Важно отметить, что фенотип, создаваемый любой конкретной siRNA, представляет собой биологическую сумму канонического сайлейсинга «на мишени», опосредуемого всеми 21 нуклеотидами, и беспорядочного сайлейсинга «вне мишени», опосредуемого затравочной последовательностью из шести-семи нуклеотидов (17, 18). Последний может привести к сайлейсингу сотен мишеней, к сожалению, приводя к его доминированию над фенотипами и результатами скрининга siRNA (19). Соответственно, были выбраны два взаимодополняющих подхода для подтверждения данных о LZK, нокауты генов, опосредованные siPOOL и короткими палиндромными повторами, регулярно расположенными группами (CRISPR). siPOOL представляют собой пулы из 30 siRNA, нацеленных на общий ген. Поскольку каждая из 30 компонентных siRNA имеет различный набор сайтов вне мишени, но разделяет общий сайт на мишени, siPOOL обеспечивает 30-кратное обогащение в отношении сайлейсинга на мишени в сравнение с сайлейсингом вне мишени (20). Как и ожидалось, в то время как siPOOL, нацеленный на Lzk, только в минимальной степени улучшал выживаемость первичных RGC,

комбинация siPOOL, нацеленных на Dlk и Lzk, была очень синергетической с точки зрения как выживаемости (фиг. 19D), так и подавления передачи сигналов от JNK (фиг. 19E). Фенотип не был артефактом анализа CellTiter-Glo, поскольку аналогичные результаты были получены с использованием обычных красителей для оценки жизнеспособности (фиг. 19F). В случае подхода к нокауту с помощью CRISPR использовался тот факт, что платформа для первичных RGC была построена вокруг доставки коротких интерферирующих РНК (т.е. siRNA). Выделив RGC из мышей, экспрессирующих Cas9 *S. pyogenes* (spCas9) в локусе Rosa26 (21), и взамен осуществляя трансфекцию с использованием *in vitro*-транскрибированных синтетических РНК-проводников (sgRNA), Cas9 могла быть нацелена на расщепление в данном гене-мишени. Затем клетки репарируют этот расщепленный участок с помощью соединения негомологичных концов, что приводит к небольшой (~1-20 п.о.) вставке/делеции, которая может сдвигать рамку считывания нижерасположенного белка. Для валидации подхода был синтезирован ряд sgRNA против Dlk, и было установлено, что они действуют синергически с siPOOL, нацеленными на Lzk, с увеличением выживаемости (фиг. 19G), и что они создают специфические для мишени вставки/делеции без обнаруживаемых эффектов вне мишени (фиг. 19H). Реципрокный подход, т.е. siPOOL, нацеленные на Dlk, и sgRNA, нацеленная на Lzk, дал аналогичный результат (фиг. 19I), как и использование только sgRNAs, т.е. sgRNA, нацеленной на Dlk, и sgRNA, нацеленной на Lzk (фиг. 19J). Мыши с Dlk, фланкированным loxP-сайтами, недавно были получены и подтверждены нокаутом *in vitro* (фиг. 19K). Гомозиготных по Dlk<sup>fl/fl</sup> Lzk<sup>fl/fl</sup> мышей разводили и исследовали, чтобы увидеть, приводит ли совместное целенаправленное разрушение Lzk и Dlk *in vivo* к увеличению выживаемости RGC и подавлению пути с участием JNK после повреждения зрительного нерва. Однако, по меньшей мере, в случае первичных RGC ясно, что LZK может опосредовать передачу сигналов о повреждении, когда DLK является нефункциональным, требуя одновременного ингибирования DLK и LZK для максимальной нейропротекции.

Затем была предпринята попытка идентифицировать не являющихся киназами членов пути передачи сигналов о повреждении, и, таким образом, авторы настоящего изобретения расширили платформу для скрининга библиотеки из 16877 минипулов siRNA (по четыре на ген), нацеленных на весь геном. С целью улучшения отношения сигнал-шум в анализе и облегчения скрининга в масштабе всего генома, был использован тот факт, что ингибирование LZK мало способствует улучшению базовой выживаемости, но сенсibiliзирует клетки к дальнейшему ингибированию DLK. Таким образом, помимо стандартного минипула siRNA библиотеке, каждая лунка также получила siPOOL, нацеленный на Lzk. Для анализа результатов был использован тот факт, что в скрининги в масштабах генома отбирают siRNA с каждой возможной комбинацией затравок многократно, что позволяет использовать два различных биоинформационных подхода для устранения распространяющихся эффектов вне мишени. Во-первых, можно проследить эффект данной затравки на выживаемость, так как она появляется в библиотеке десятки раз. Затем его можно использовать для получения поправочного коэффициента, который помогает вычесть вклад в фенотип сайлейсинга вне мишени и выявить компонент, опосредованный сайлейсингом на мишени (19). Во-вторых, в дополнение к знанию выживаемости/токсичности, вызванной каждой затравкой, можно также предсказать все возможные сайты вне мишени. Затем, используя анализ Хейстека для поиска обычно поражаемых генов с помощью затравок с аналогичным поведением, можно фактически попытаться деконволюировать эффекты вне мишени и идентифицировать гены, чей сайлейсинг вне мишени влияет на выживаемость (22).

Когда результаты с использованием первого метода (с поправкой на затравку, на мишени) были проанализированы, было обнаружено, что DLK был стоящим на первом месте геном среди всех 16877 генов (фиг. 20A). Более того, все из MKK4, MKK7, JNK1, JNK2, JNK3 все заняли 1% мест в начале ряда (не представленные данные). Скрининг также выявил два известных JNK-зависимых фактора транскрипции, JUN и ATF2. Первый был ранее подтвержден в качестве основного медиатора гибели клеток RGC в модели

повреждения зрительного нерва на грызунах (23). Для исследования роли последнего, первичные RGC были выделены из мышей дикого в сравнение с мышами с *Atf2*, фланкированным loxP-сайтами, (24), и трансдуцированы экспрессирующим Cre в сравнение с GFP аденовирусом. Как и ожидалось, целенаправленная делеция *Atf2* привела к увеличению выживаемости, сравнимому с таковым, вызванным делецией *Dlk* (фиг. 20B). Вместе эти результаты обеспечили уверенность в том, что скрининг был способен идентифицировать известных членов пути с участием DLK/JNK. Затем была предпринята попытка подтвердить новые гены, которые ранее не связывались с DLK или JNK. Наилучшим результатом скрининга, с использованием анализа Хейстека, стал транскрипционный фактор SRY-бок 11 (ответственная за определение пола область Y-хромосомы-бок 11) (*SOX11*). Ранее было установлено, что наряду с *SOX4* *SOX11* является важным для выживания и дифференцировки RGC во время развития (25). Для подтверждения того, что *SOX11* играет парадоксальную роль в гибели клеток RGC, сначала был исследован *siPOOL*, нацеленный на *Sox11*, и было обнаружено, что он действительно взаимодействует с *siPOOL* или против *Lzk* (фиг. 20C), или против *Dlk* (не представленные данные) с увеличением выживаемости первичных RGC. Две модели нокаута: трансдуцирование *Sox11<sup>fl/fl</sup>* RGC (26) с использованием аденовируса, экспрессирующего Cre в сравнении с GFP (фиг. 20D), были исследованы, и трансфицировали RGC с нокином *spCas9* с использованием *sgRNA*, нацеленных на один экзон *Sox11* (фиг. 20E). В обоих случаях целенаправленное разрушение *Sox11* увеличивало выживаемость RGC. Тот факт, что этот ген выживания в ходе развития может играть роль в передаче сигналов о повреждении у взрослых, подтверждается исследованиями на микрочипах, которые показали, что *SOX11* является одним из самых в высокой степени активируемых генов в ответ на раздавливание зрительного нерва и почти полностью DLK-зависимый образом (6). Мышь *Sox11<sup>fl/fl</sup>* в настоящее время используется для подтверждения фенотипа выживания *in vivo*. Чтобы гарантировать, что потенциальные члены пути гибели клеток RGC не были пропущены, поскольку чувствительность скрининга была чрезмерно повышена к ответу на

ингибирование пути с участием DLK, в отсутствие siPOOL, нацеленного на Lzk, был проведен скрининг другой библиотеки siRNA, нацеленных на весь геном. Первичные RGC были трансфицированы ранжированной библиотекой из 52725 siRNA, нацеленных на 17575 генов. Снова наилучшие результаты скрининга включали известные гены, такие как DLK, JUN, ATF2, MKK4 и MKK7. Однако на этот раз авторы настоящего изобретения также идентифицировали еще один фактор транскрипции, миоцит-специфический энхансерный фактор 2A (MEF2A), который играет важную роль в выживаемости и дифференцировке нейронов (27–29). Как и в случае других кандидатов, MEF2A был проверен с использованием siPOOL (не представленные данные), sgRNA (не представленные данные) и RGC, выделенных от мышей с условным нокаутом (*Mef2a<sup>fl/f</sup>*), (30) и трансдукции с использованием адено-Cre в сравнение с -GFP (фиг. 20F). Кроме того, было установлено, что нокаут MEF2A *in vivo* защищает RGC в модели раздавливания зрительного нерва мыши (фиг. 20G). Наконец, с использованием мышей *Dlk1<sup>fl/fl</sup>* было показано, что MEF2A фосфорилируется в ответ на повреждение аксона зависимым от DLK образом (фиг. 20H).

К этому моменту были идентифицированы четыре различных фактора транскрипции (т.е. ATF2, JUN, SOX11, MEF2A), каждый из которых оказывал частично протективный эффект при повреждении. Учитывая урок чрезмерности от DLK и LZK, была рассмотрена возможность того, что эти четыре фактора транскрипции, возможно, должны быть одновременно ингибированы для максимальной нейропротекции. Таким образом, RGC дикого типа трансфицировали с использованием siPOOL, нацеленных на *Mef2a*, *Jun*, *Sox11* или *Atf2*, по отдельности или в комбинации, и выживаемость определяли через 96 часов. Результаты показали, что ингибирование четырех факторов транскрипции является в высокой степени синергетическим, увеличивая выживаемость не меньше, чем одновременное ингибирование DLK/LZK (фиг. 21A). Для определения того, находятся ли эти четыре фактора транскрипции фактора генетически ниже DLK, RGC дикого типа трансфицировали siPOOL против *Dlk/Lzk* вместе с или без siPOOL, нацеленных на четыре фактора транскрипции. Через два дня передача сигналов от DLK

была восстановлена с помощью аденовируса (экспрессирующего нечувствительную к siRNA мыши DLK крысы), и выживаемость определяли спустя еще два дня. Тогда как 80-90% RGC погибали при сверхэкспрессии DLK в присутствии четырех факторов транскрипции, одновременный нокадаун MEF2A, SOX11, JUN и ATF2 полностью отменял гибель клеток (фиг. 21B). Наконец, используя комбинацию нокаутов JNK1-3 и MKK4/7 и сверхэкспрессию DLK (не представленные данные) или LZK (фиг. 21C), было продемонстрировано, что DLK/LZK не оказывают токсических эффектов в отсутствие интактного пути MKK/JNK. В целом, функциональный геномный скрининг можно обобщить с помощью модели, в которой повреждение аксонов запускает каскад передачи сигналов от киназ DLK/LZK, MKK4/7 и JNK 1-3, что приводит к активации четырех факторов транскрипции, MEF2A, SOX11, JUN и ATF2, и в конечном итоге гибели клеток.

Нацеливание на DLK в качестве нейропротективной стратегии в случае глаукомы имеет несколько привлекательных особенностей. Как упомянуто выше, DLK обладает устойчивым, эволюционно консервативным фенотипом (5, 31), она была идентифицирована с использованием объективного метода и легко поддается воздействию лекарственными средствами - ингибиторами в виде небольших молекул. Кроме того, это было подтверждено независимо, и ингибирование DLK, а не просто задержка гибели клеток, по-видимому, полностью предотвращает ее (6). Кроме того, оставшиеся в живых клетки с ингибированием DLK, остаются электрофизиологически активными *in vitro* (5) и *in vivo* сохраняют относительно здоровый характер экспрессии генов, несмотря на их предшествующее повреждение (6). Наконец, некоторые (4, 6, 8), но не все (32) данные говорят о том, что DLK играет роль в программе дегенерации аксонов, запускаемой повреждением аксонов. С другой стороны, ингибирование DLK замедляет регенерацию аксонов (6), что является потенциальным ограничением в отношении создания стратегий нейрорегенерации (33-35). Это подчеркивает необходимость в отделении членов пути, ответственных за решения о гибели клеток, от тех, которые отвечает за регенерацию аксонов. Кроме того, несмотря на их центральную роль в гибели (и регенерации) клеток, механизмы, с помощью которых DLK и LZK

активируются в ответ на повреждение аксонов, и посредством которых они активируют нижерасположенные факторы транскрипции, еще предстоит выяснить.

Как здесь раскрыто, функциональный геномный скрининг был объединен с терапевтической платформой CRISPR/AAV для дальнейшего изучения пути гибели клеток с участием DLK/LZK и плавного запрета активности различных потенциальных мишеней с нейропротективным действием с помощью жизнеспособного вектора для генной терапии.

В некоторых вариантах осуществления расширенная совокупность принципов скрининга на основе РНК, используя sgRNA и сети siRNA, будет использоваться для идентификации новых членов пути с участием DLK/LZK, включая пока не идентифицированный вышерасположенный активатор(ы) и мишени, которые могут разобщить гибель и регенерацию клеток. В некоторых вариантах осуществления будет разработан CRISPR/AAV вектор, который позволит быстро проверять наилучшие результаты поиска из SA1 в модели нейропатии зрительного нерва на грызунах. Будут созданы варианты этих нейропротективных вирусов, которые будут подходить для применений в генной терапии, тем самым расширяя возможности включения в качестве потенциальных мишеней не поддающихся лечению лекарственными средствами продуктов генов и даже сетей генов. В некоторых вариантах осуществления комбинация протеомики и экспериментов по потере функции/усилению функции будет использоваться для исследования механизма, посредством которого DLK регулирует нижерасположенный медиатор, MEK2A, и определения, может ли ингибирование MEK2A служить терапевтической стратегией для стимулирования выживаемости RGC без предотвращения регенерации.

С точки зрения механизма, платформа для скрининга уникальным образом объединяет первичный нейрон, связанный с заболеванием, (т.е. RGC), со скринингами на основе ранжированных РНК для всего генома, которые могут быть завершены за несколько недель, с предоставлением объективного и всеобъемлющего инструмента для лучшего понимания передачи сигналов о гибели клеток RGC. Действительно, SOX11, важный для развития RGC,

является прекрасным примером того, как такой подход может сделать новые и неожиданные открытия о генах, вовлеченных в гибель клеток. Предлагаемые ниже модификации (т.е. для скрининга сетей генов и использования технологии CRISPR) откроют возможности для идентификации потенциально нейропротективных мишеней, которые могут быть идентифицированы.

С терапевтической точки зрения редактирование с помощью CRISPR в RGC будет использоваться для разработки основанной на AAV/CRISPR терапии *in vivo*. В некоторых вариантах осуществления упаковка двух отдельных цистронов (т.е. одного, экспрессирующего gRNA, а другого, экспрессирующего spCas9) AAV/CRISPR в одну частицу AAV, преодолевает основное ограничение в использовании CRISPR для генной терапии. Это создает потенциал для подхода, основанного на генной терапии, как для валидации наилучших результатов скринингов авторов настоящего изобретения с резко увеличенной пропускной способностью, так и для возможности терапевтического нацеливания на этих членах пути, включая тех, которые не поддаются легко лечению лекарственными средствами в виде небольших молекул. В целом, как сам путь-мишень с участием DLK, так и эти подходы составляют инновационную стратегию для разработки новых нейропротективных терапий для глаукомы и других форм заболеваний зрительного нерва.

Используйте улучшенные скрининги на основе РНК в первичных RGC для идентификации новых членов пути с участием DLK/LZK, включая пока не идентифицированные вышерасположенные активаторы.

Механизм, посредством которого DLK и LZK активируются в ответ на повреждение зрительного нерва, еще предстоит определить. У *D. melanogaster* и *C. elegans*, лигаза E3 (называемая Highwire и RPM-1, соответственно), подавляет базальные уровни белка гомолога DLK (называемого Wallenda и DLK-1 соответственно). В ответ для повреждения аксонов это подавление ослабляется, что приводит к накоплению DLK и гибели клеток. Интересно отметить, что роль гомолога Highwire/RPM-1 у мыши, Phr1, менее ясна. Как и следовало ожидать, разрушение Phr1 в ганглиозных клетках заднего корешка увеличивает уровень DLK (36, 37), но в RGC нокадаун Phr1 не влияет на уровни DLK или

выживаемость (не представленные данные), и мышь с условным нокаутом гена *Phr1* демонстрирует нормальную выживаемость RGC (38, 39). Внутренний чувствительный к кальцию мотив, описанный в *C. elegans*, DLK-1 (40), по-видимому, не является функционально консервативным, поскольку замена эндогенного мышинового LZK (единственного мышинового гомолога DLK-1, который содержит этот мотив) человеческим LZK дикого типа или мутантом, лишенным гексапептидного мотива, приводит к эквивалентной гибели клеток (фиг. 4). Наконец, у позвоночных существует несколько сайтов фосфорилирования DLK, включая S643, S302, S295, S302, T306 и S643, которые, по-видимому, не регулируются известными киназами вроде DLK (т.е. JNK и DLK), что указывает на возможность новых, вышерасположенных регуляторных киназ (37). Хотя чувствительности скринингов кинома и генома, описанные выше, были повышены для поиска членов пути с участием DLK, никакие гены, расположенные выше DLK/LZK, не были идентифицированы. Следует отметить, что эти скрининги имели два внутренних недостатка. Во-первых, нокдаун, а не нокаут, может быть недостаточным для получения фенотипа для некоторых генов. В поддержку этой идеи было установлено, что скрининги, основанные на нокдауне, могут давать отличные наилучшие результаты по сравнению непосредственно со скринингами, основанными на нокауте (41). Во-вторых, как и в случае с DLK/LZK, MKK4/7, JNK1/2/3 и SOX11/ATF2/JUN/MEF2A, может потребоваться одновременное ингибирование множества членов данного уровня, чтобы получить устойчивый фенотип. Для устранения этих потенциальных недостатков, в стратегию скрининга авторов настоящего изобретения будут внесены два ключевых изменения. Для первоначальных повторных скринингов авторов настоящего изобретения внимание будет сосредоточено на киноме, учитывая его относительно небольшой размер, биологическую активность и пригодность к употреблению.

1. Проведите скрининг ранжированной библиотеки sgRNA, нацеленных на киноме мыши, для идентификации генов, целенаправленное разрушение которых увеличивает выживаемость RGC.

Для устранения первого недостатка, упомянутого выше, будет

проведен скрининг на основе CRISPR, несколько аналогичный системе iCRISPR (42). Стаю мышей, экспрессирующих spCas9, масштабировали, и была продемонстрирована устойчивая выживаемость, когда авторы настоящего изобретения выделили RGC из этих мышей и трансфицировали их с использованием sgRNA вместо siRNA (фиг. 19G-J). Действительно, Z' был между 0,3 и 0,5, при этом 0,5 указывает на то, что клетки, трансфицированные в ходе скрининга положительной контрольной sgRNA (т.е. нацеленной на Dlk), демонстрируют выживаемость, которая выше на более чем на 12 стандартных отклонений таковой клеток, трансфицированных контрольной trancRNA (у которой отсутствует 20-нуклеотидная протоспейсерная последовательность, которая направляет ее к конкретному гену). Как показано на фиг. 19G и J, вариабельность среди различных sgRNA, нацеленных на один и тот же ген, довольно мала, и что три sgRNA на ген должны иметь достаточный охват. Как это было сделано с DLK и LZK, будут выбраны сайты-мишени, которые имеют последовательность GN<sub>19</sub>NGG, чтобы быть совместимыми с T7-транскрипцией и прилегающим к протоспейсеру мотивом (PAM) для spCas9. Приоритет будет отдан тем сайтам, которые согласно биоинформационным прогнозам будут расщепляться больше на мишени и меньше вне мишени (43-45). Более того, сайты-мишени будут отбираться в 5'-половине гена и, по возможности, в важных доменах. Первое гарантирует, что мутации со сдвигом рамки считывания, вызываемые вставками/делециями, затронут более половины оставшегося белка, в то время как последнее позволяет одной трети вставок/делеций, которые остаются в рамке считывания, все еще нарушать функцию белка. Для обеспечения прямого сравнения с прошлой работой, библиотека будет нацелена на те же 623 киназы, которые присутствуют в библиотеке siRNA, нацеленных на кином, Sigma. Для высокопроизводительного синтеза матрица для транскрипции каждой sgRNA представляет собой геноспецифический олигонуклеотид из 60 п.о., подвергнутый отжигу с общим элементом из 80 п.о., который содержит последовательность tracrRNA (46).

Для скрининга RGC от мышей с нокином spCas9 будут подвергнуты иммунопэннингу и посеяны по 1000 клеток на лунку в

384-луночные планшеты. Библиотека sgRNA будет подвергнута обратной трансфекции с использованием NeuroMag (Oz Biosciences), используя 30 нг на лунку в двух повторах. Поскольку 1 нМ siPOOL против Lzk хорошо работал для повышения чувствительности библиотеки siRNA, нацеленных на весь геном, к ингибированию DLK, тот же реагент будет добавлен во все лунки этого скрининга. Каждый планшет будет содержать отрицательные (tracrRNA) и положительные (Dlk) контрольные sgRNA, которые служат в качестве контролей качества и стандартов нормирования (для обеспечения возможности сравнений планшета с планшетом). Через 48 часов каждую лунку обработают 1 мкМ колхицином для стимулирования передачи сигналов от DLK/LKZaJNK и уменьшения фоновой выживаемости (15, 47). Наконец, спустя еще 48 часов, выживаемость будет определяться с использованием CellTiter-Glo и приводиться к лункам с медианным отрицательным контролем в каждом планшете. Гены будут оцениваться и ранжироваться на основе среднего значения и медианной активности для трех sgRNA. Активные sgRNA будут повторно проверены в RGC с spCas9 и RGC дикого типа, чтобы гарантировать, что активность является spCas9-зависимой. Как и в случае с siRNA, вторичный скрининг будет выполняться путем синтеза новых sgRNA с последовательностями, не исследованными при первоначальном скрининге.

Учитывая, что платформа трансфекции первичных RGC с использованием РНК и определения выживаемости была тщательно проверена, никаких проблем с самим скринингом не ожидается. Более того, с учетом результатов скрининга siRNA, нацеленных на весь геном, в котором siPOOL, нацеленный на Lzk, использовался для повышения чувствительности системы к ингибированию DLK и был получен минипул siRNA, нацеленных на Dlk, в качестве наилучшего результата среди 16877 генов, эта стратегия сможет идентифицировать членов пути с участием DLK. Основной проблемой будет работа, связанная с синтезом библиотеки sgRNA. Далее рассматриваются организация пулов матриц и транскрибирование пулов трех sgRNA *in vitro*. Множество sgRNA, нацеленных на один и тот же ген, должно уменьшить вероятность того, что данный локус

избежит нацеливания, если все вставки/делеции случайно окажутся множествами из трех нуклеотидов. Однако, по меньшей мере, в случае LZK и DLK, повышенной эффективности со стратегией организации пулов не наблюдалось (фиг. 19J), возможно, из-за уже высокой частоты появления вставок/делеций (фиг. 19H). Чтобы обойти некоторые меньшие киназы, имеющие слишком мало приемлемых мишеней для *spCas9*, *siTOOLS* (Мюнхен, Германия) будет использован для исследования *sgRNA* с 5' слиянием с рибозимом типа *hammerhead* (фиг. 23), тем самым устраняя необходимость начинать *sgRNA* с гуанина (поскольку T7-транскрипция начинается с рибозима) и увеличивая количество мишеней в четыре раза. Было установлено, что эта система дает правильные продукты расщепления, и в настоящее время проверяют эффективность *sgRNA*, полученных таким способом (фиг. 23). Наконец, библиотеки *sgRNA* мыши теперь коммерчески доступны от *Dharmacon*, если это необходимо. Библиотека *Dharmacon*, включающая котрансфекцию геноспецифической *crRNA* и общей *tracrRNA*, имела только 50% активности химерных *sgRNA*, использованных выше (не представленные данные). В случае успеха следующим шагом будет разработка и скрининг библиотек *sgRNA*, нацеленных на весь геном.

2. Проведите скрининг библиотеки *siRNA*, сгруппированной для нацеливания на сети киназ, чтобы идентифицировать гены, нокдаун которых увеличивает выживаемость RGC.

Даже если киназа играет ключевую роль в гибели клеток RGC, ее фенотип при ингибировании может быть замаскирован избыточными/компенсаторными киназами. Скрининги с повышенной чувствительностью были одним из способов обойти это ограничение, но полагались на то, что уже знали одного члена избыточной пары (например, LZK при скрининге всего генома). В качестве альтернативы, более объективного подхода, библиотека *siRNA* может быть подвергнута скринингу, в которой каждая лунка одновременно нацеливается на множество киназ, сгруппированных, поскольку они могут быть частью избыточной сети передачи сигналов. Библиотека нацеленных на кином *siRNA* *Sigma* будет первоначально использована, сконцентрирована в 623 минипула (три *siRNA* на ген), а затем минипулы объединят в новые комбинации. Поскольку

не представляется возможным испробовать все комбинации пар киназ (6232), три различных биоинформационных подхода будут использоваться для создания пулов из минипулов. Во-первых, и концептуально самое простое, siRNA, нацеленные на киназы с наибольшей степенью гомологии (например, JNK1, 2 и 3), будут сгруппированы вместе. Согласно базе данных ENSEMBL, 488 генов в библиотеке нацеленных на киназы siRNA Sigma имели значительную гомологию с другим членом, что привело к 1626 парам (поскольку конкретный ген может быть гомологичен более чем одному другому члену). Чтобы сделать количества более управляемыми, эти пары были далее сгруппированы в 111 групп с медианой четыре члена на группу. Во-вторых, киназы с перекрывающимися спектрами субстратов могут быть избыточными. Реакции фосфорилирования с использованием 289 киназ человека были выполнены на белковых микрочипах, состоящих из 4191 уникального полноразмерного белка человека, и было идентифицировано 3656 связей киназа-субстрат (48). Из 198 генов в библиотеке нацеленных на киназы siRNA Sigma, которые были включены в анализ, было 2089 пар со значительным перекрытием их субстратных спектров. Поскольку киназы могут иметь перекрывающиеся спектры с более чем одной другой киназой, это привело к 3386 потенциальным группам с медианой 11 генов на группу. Наконец, воспользовались тем фактом, что все 121 киназы и все их комбинации пар, в *S. cerevisiae*, были проанализированы на предмет генетических взаимодействий с целью получения подробной карты эпистазиса (E-MAP) (49). Было высказано мнение, что некоторые из этих парных генетических взаимодействий могут быть сохранены у мышей и, в некоторых случаях, указывают на избыточных/компенсаторных членов пути (генетический субстрат взаимодействия с искусственной летальностью). В библиотеке Sigma было идентифицировано 1674 парных киназных взаимодействия среди 223 киназ, которые имеют дрожжевой гомолог, в результате чего образовалось 1003 группы с медианным размером два гена. В общей сложности 4500 групп siRNA, при этом самая большая группа содержала 19 киназ. Наконец, был проведен предварительный эксперимент, чтобы гарантировать, что пулы с наибольшим количеством мишеней (например, 19 киназ), большинство из

которых, вероятно, будут неактивными, не разбавят активную пару. Снова было отмечено, что RGC, трансфицированные минипулами siRNA, нацеленных на Dlk и Lzk, создавали обнаруживаемый фенотип, даже при разбавлении в 64 раза неактивной siRNA (фиг. 24A). Сам скрининг будет проведен в двух повторах, при этом каждой планшет будет содержать отрицательные (Lzk/Lzk) и положительные контроли (Dlk/Lzk) для синергизма и в качестве стандартов нормирования. Данные о выживаемости будут скорректированы с помощью уже полученных авторами настоящего изобретения факторов коррекции на затравочную последовательность и добыты для поиска комбинаций, которые появятся во множестве лунок, способствующих выживаемости. Затем эти пулы будут деконволюционированы для идентификации активных медиаторов. Наконец, вторичное подтверждение будет включать использование независимых siRNA с последовательностями, не исследованными в библиотеке Sigma.

Авторы настоящего изобретения подтвердили, что три их подхода к созданию комбинаций киназ дают перечни, которые включают по меньшей мере одну известную взаимодействующую киназу (например, фосфо-сети-JNK1/2/3 и MKK4/7; гомологи - JNK1/2/3, MKK4/7 и DLK/LZK; E-MAP-DLK/LZK дрожжей). Кроме того, поскольку скрининги могут быть выполнены в течение нескольких недель, процесс может быть повторным, при этом результаты скрининга приводят к модификациям алгоритмов группировки. Фактическое конструирование библиотеки должно быть относительно простым, учитывая доступ к акустической станции дозирования и раздачи воды Labcyte Echo 550, которая может собрать все 4500 групп за считанные часы, без использования наконечников пипеток. Одним из препятствий может быть объединение столь большого количества siRNA в одной лунке, что может привести к многочисленным взаимодействиям вне мишени. В качестве дополнительной или альтернативной стратегии, siTOOLS (Мюнхен, Германия) может быть использован для конструирования библиотеки кинема мышцы с использованием siPOOL. Это создало бы преимущество, заключающееся в увеличении количества эффектов нацеливания на мишень в 30 раз. Действительно, когда клетки A439 были

трансфицированы siRNA в сравнение с siPOOL, нацеленными на киназы, и проанализированы на выживаемость, siRNA, нацеленные на тот же ген, имели только  $R2=0,19$  (фиг. 24B). Для сравнения, независимые siPOOL, нацеленные на тот же ген, имели  $R2=0,71$ .

3. Определите, влияют ли прошедшие валидацию результаты скрининга из раздела 1 или 2 выше на передачу сигналов от DLK/LZK.

Как было сделано с DLK и LZK (фиг. 19E), RGC будут трансфицированы siRNA, siPOOL или sgRNA (из раздела 1 и 2 выше), нацеленными на прошедшие валидацию киназы, отдельно или в комбинации с siPOOL, нацеленным на Lzk (для сенсibilизации клеток к ингибированию пути) и подвергнуты иммуноблоттингу для обнаружения фосфорилированных MKK4, MKK7 (прямых субстратов DLK/LZK), JNK и JUN через 24-48 часов. Киназы, нокдаун или нокаут которых подавляют передачу сигналов от JNK, будут считаться потенциальными вышерасположенными активаторами DLK/LZK. Те, которые способствуют выживаемости, не влияя на фосфорилирование MKK/JNK, должны снижать чувствительность к DLK, поскольку этого достаточно для запуска гибели клеток RGC.

Несмотря на то, что эффекты siRNA легко обнаружить на не подвергнутых отбору, целых популяциях, sgRNA более трудны, поскольку нокауты не происходят в 100% клеток. Чтобы решить эту проблему, RGC будут трансфицированы sgRNA и подвергнуты стандартному 96-часовому протоколу с использованием колхицина для обеспечения сильного селекционного давления и увеличения количества нокаутированных клеток. Затем, в зависимости от количества оставшихся клеток, состояние пути с участием JNK будет определяться с помощью иммуноблоттинга в отношении фосфорилирования JNK или иммунофлуоресценции с использованием антител против фосфорилированного JUN.

4. Определите, функционируют ли генетически выше или ниже DLK и LZK прошедшие валидацию результаты скрининга из раздела 1 или 2.

RGC будут трансфицированы, как в разделе 3, и затем, после достаточного времени для отбора, оставшиеся клетки будут подвергнуты заражению аденовирусом со сверхэкспрессией DLK крысы

или LZK человека дикого типа. Гены, которые находятся выше DLK/LZK, должны иметь свой фенотип нокдаун/нокаута, реверсируемый с помощью сверхэкспрессии DLK/LZK. Как и в случае дополняющего подхода, будут продуцироваться аденовирусы, сверхэкспрессирующие кДНК для киназ-кандидатов (включая любые известные мутанты, которые делают киназу конститутивно активной), и будет проверяться, способствует ли их сверхэкспрессия гибели клеток RGC, и может ли она быть блокирована с помощью ингибиторов DLK/LZK и/или siRNA, нацеленной на Dlk/Lzk, (как бы следовало ожидать, если они функционируют выше DLK/LZK).

Реверсия фенотипа выживания может быть осуществлена с помощью легкодоступного экспрессирующего DLK крысы дикого типа аденовируса и не являющегося истинно конститутивно активным мутанта авторов настоящего изобретения. Если фенотип выживания может быть реверсирован, мутант DLK (S584A/T659A), который, как считается, имеет повышенную активность (50), будет субклонирован и экспрессирован. Наконец, хотя основная цель раздела 1 выше состоит в том, чтобы идентифицировать вышерасположенные активаторы DLK и LZK, будут рассматриваться киназы, которые, по-видимому, функционируют ниже/независимо от DLK/LZK.

5. Определите, способствуют ли выживаемости без влияния на регенерацию аксонов прошедшие валидацию результаты скрининга из раздела 1 или 2.

RGC будут трансфицированы siRNA, siPOOL или sgRNA (из раздела 1 и 2), которые нацелены на прошедшие валидацию киназы, отдельно или в комбинации с siPOOL, нацеленным на Lzk, (для сенсibilизации клеток к ингибированию пути) и через 72 часа окрашены кальцеином AM. Автоматизированный микроскоп Cellomics будет использоваться для визуализации клеток и расчета общей длины аксона. В идеале должны быть идентифицированы гены, ингибирование которых способствует выживаемости без влияния на рост аксонов.

Для подтверждения того, что анализ роста аксонов может быть прогностическим фактором регенерации *in vivo*, авторы настоящего изобретения ранее показали, что первичные RGC, обработанные

ингибиторами DLK/LZK и/или siRNA против DLK/LZK, имеют резко уменьшенную длину аксонов по сравнению с клетками, обработанными контролем (фиг. 24C), Кроме того, дополняющие эксперименты в разделе 2 могут быть использованы для валидации актуальности результатов авторов настоящего изобретения *in vivo*.

6. Разработайте систему CRISPR, совместимую с доставкой AAV, для отключения функции гена-мишени в RGC *in vivo*.

В результате скрининга ранее было идентифицировано множество нейропротективных мишеней в RGC, и подходы, изложенные в разделах 1 и 2, еще больше расширяют перечень кандидатов. Дополнительные этапы включают: валидацию этих наилучших результатов скрининга *in vivo* в моделях нейропатии зрительного нерва на грызунах, ранжирование по приоритету прошедших валидацию результатов скрининга и последующую разработку специфических ингибиторов приоритетных мишеней. Потенциально идеальным подходом была бы стратегия на основе генной терапии, которая могла бы как быстро подтвердить наилучшие результаты скрининга (т.е. гены с нокаутом *in vivo* без необходимости создания/получения нокаутированных мышей), так и позже служить в качестве самого терапевтического способа. Как показано на фиг. 19G-J, системы на основе CRISPR могут использоваться в RGC для надежного нарушения функции генов *in vitro*. Технология CRISPR будет использоваться для *in vivo* редактирования генома RGC, используя преимущества способности AAV2 к эффективной трансдукции RGC (9, 10). К сожалению, капсиды AAV имеют пакующую емкость ~4,8 т.о., что препятствует доставке кассет и для экспрессии spCas9 (~4,8 т.о.), и экспрессии gRNA (~0,4 т.о.) в одном вирусе. Системы AAV/CRISPR использовались *in vivo*, но приходилось полагаться либо на: 1) использование двух различных AAV (51), что является субоптимальным для генной терапии, либо; 2) использование меньшего Cas9 *S. aureus* (saCas9) (52), который имеет более ограничивающий PAM и уменьшает количество потенциальных сайтов-мишеней в четыре раза. Эта проблема усугубляется тем фактом, что gRNA обычно экспрессируются с промотора U6, который иницируется в гуанине, что ограничивает

сайты-мишени последовательностями GN<sub>19</sub>NGG (spCas9) или GN<sub>19</sub>NNGRRT (saCas9). Недавно было показано, что промотор H1, который может инициировать транскрипцию или в аденине, или в гуанине, удваивает количество потенциальных Cas9-мишеней (53). В природе, промотор H1 управляет транскрипцией своего канонического транскрипта Pol III, H1RNA, в одном направлении, а в другом направлении - повсеместно экспрессируемого транскрипта Pol II, называемого Parp2 (54, 55) (фиг. 28A). Эта компактная (~0,2 т.о.) двунаправленная архитектура H1 позволяет экспрессировать spCas9 и gRNA с одного промотора и упаковывать их в один AAV вектор.

Для проверки этой системы была создана конструкция AAV, в которой использован промотор H1 для экспрессии слияния mCherry-гистон 2B в направлении Pol II и gRNA против Dlk#4 (5'-GNNNNNNNNNAGATCTNNGG-3' (SEQ ID NO:163)), которая легко нацеливается на сайт для BglIII (фиг. 19G и 1H) в направлении Pol III (Dlk gRNA:H1:H2B-mCherry). Поскольку общий размер составляет менее 2,4 т.о., один из инвертированных концевых повторов был мутирован для получения самокомплементарного (sc) AAV, который, как известно, увеличивает и ускоряет экспрессию генов (56). Вирусные частицы получали и использовали для трансдукции первичных RGC, выделенных из мышей с нокином spCas9-P2A-GFP. Всего через пять дней в присутствии тозасертиба (для предотвращения гибели клеток и во избежание отбора), наблюдалась устойчивая экспрессия репортера с почти 100% трансдукцией (фиг. 25B, слева) и с более чем 90% утратой сайта для BglIII, т.е. редактированием гена (фиг. 25B, справа). Отдельно клетки NIH3T3 трансфицировали плазмидой (не вирусной), которая экспрессирует как spCas9, так и gRNA с одного промотора H1, и было установлено, что это приводит к устойчивому расщеплению, сравнимому с традиционной двухвекторной системой (фиг. 25C). Вместе эти исследования валидируют систему scAAV (которая будет использоваться в разделах 8, 9 и 15) и PolII/III-компетенцию двунаправленного промотора H1. Как описано ниже, была создана система доставки одного AAV, которая экспрессировала как spCas9, так и gRNA. В некоторых вариантах осуществления

последовательности для самокомплементарного (sc) AAV могут включать нуклеотидную последовательность, выбираемую из группы, состоящей из SEQ ID NO:1398-1400.

Чтобы помочь с анализом RGC после трансдукции, была разработана проточная цитометрия на основе способа количественного определения и характеристики RGC мыши. Сетчатки выделяют, разъединяют и фиксируют с помощью ацетона (для сохранения качества нуклеиновых кислот), а затем окрашивают антителами против антигенов RGC  $\gamma$ -синуклеина (SNCG) и  $\beta$ -III-тубулина (TUJ1). SNCG+/TUJ1+ дважды положительные клетки представляют собой RGC, что подтверждается данными, что они также окрашиваются с целью выявления дополнительных маркеров RGC, Thy 1.2 и NeuN (фиг. 26А), их выживаемость снижается после раздавливания зрительного нерва (фиг. 26В и 25С), и очищенные первичные RGC имеют сходный профиль (фиг. 26В). Однако в отличие от Thy 1.2 и NeuN, экспрессия SNCG и TUJ1 не подавляется при повреждении аксонов (не представленные данные), и, таким образом, они остаются применимыми маркерами в моделях нейропатии зрительного нерва. Наконец, этот способ совместим с сортировкой клеток, и было показано, что подвергнутые сортировке клетки имеют протеомный профиль, очень похожий на таковой у подвергнутых иммунопаннингу RGC, и интактную РНК/ДНК (не представленные данные).

7. Нокаут Dlk в качестве доказательства принципа, что подход на основе scAAV/CRISPR может быть использован для нацеливания на гены *in vivo* у мышей с нокином spCas9.

Используя вирус, который прошел валидацию *in vitro* (фиг. 25В), будет оптимизирован титр вируса *in vivo*. Мыши, экспрессирующие spCas9-2A-GFP, будут получать односторонние инъекции в стекловидное тело (~1 мкл) вируса в концентрации  $10^{10}$ ,  $10^9$ ,  $10^8$  или  $10^7$  вирусных частиц/мкл (четыре мыши на группу). Через две недели, что дает достаточно времени для завершения жизненного цикла AAV, RGC будут подвергнуты количественному анализу и сортировке, как описано выше.

Наконец, геномная ДНК будет очищена и проанализирована на

предмет разрушения *Dlk*, что определяется по утрате расщепления *BglIII*, чтобы определить оптимальный титр (т.е. наибольшую степень расщепления без вызова токсичности RGC). На последнем этапе мышам, экспрессирующим *spCas9*, будут инъектировать в стекловидное тело одного глаза оптимальную дозу *scAAV2-Dlk gRNA: H1:H2B-mCherry* или контрольного вируса, который экспрессирует *gRNA* без нацеливания вместо *gRNA*, нацеленной на *Dlk*. Через две недели глаза будут подвергаться трехсекундному раздавливанию зрительного нерва (чтобы не нарушать сосудистую сеть) или имитационной контрольной процедуре, и выживаемость в четырех группах ( $n=10$  сетчаткам на группу) будет определяться с помощью проточной цитометрии *SNCG/TUJ1* еще через две недели. В будущем, совместимость этой системы будет проверяться с помощью внутривенного введения *AAV9* векторов, так как этот подход, как было установлено, приводит к эффективной трансдукции RGC (57, 58).

На основании уже описанных экспериментов с мышами с *Dlk*, фланкированным *loxP*-сайтами, известно, что целенаправленное разрушение *Dlk* увеличивает выживаемость RGC (5). Более того, известно, что нокаут на основе CRISPR работает *in vitro*. Таким образом, представляется весьма вероятным, что увеличение выживаемости будет обнаружено в тех RGC, которые трансдуцированы *gRNA*, нацеленной на *Dlk*. Если  $>50\%$  расщепления или фенотип выживания не наблюдается, будут проанализированы *mCherry*-экспрессирующие *AAV*-трансдуцированные клетки. Это должно быть легко достижимо, поскольку метод проточной цитометрии в настоящее время работает уже с четырьмя каналами (фиг. 26A).

8. Используйте систему *scAAV/CRISPR* для подтверждения того, что наилучшие результаты скрининга, идентифицированные в *SA1*, являются медиаторами гибели клеток RGC в модели раздавливания зрительного нерва мыши.

На идентифицированные гены, нокаун или нокаут которых увеличивает выживаемость RGC *in vitro*, будут осуществляться нацеливание *in vitro* с помощью *gRNA*, и они будут исследоваться, как описано для *DLK* в разделе 7. Приоритет будет отдан тем генам, которые, по-видимому, функционируют выше *DLK* или которые,

как представляется, не влияют на регенерацию. Как и в случае с DLK, множество gRNA для каждого гена-мишени будет исследоваться в первичных RGC для идентификации наиболее эффективных из них для продвижения в систему AAV. Наконец, мишени, предположительно находящиеся выше DLK, будут проверены для определения того, подавляют ли они путь *in vivo*, путем иммуноокрашивания плоского среза сетчатки на фосфорилированные JUN и DLK (5).

Гены, полученные в разделе 1, должны быть простыми для исследования *in vivo*, так как скрининг идентифицирует активные gRNA. Однако, поскольку чувствительность скрининга была повышена с помощью siPOOL, нацеленного на Lzk, возможно, что фенотип *in vivo* потребует ингибирования LZK или DLK. К счастью, при осуществлении условного нокаута Lzk была использована стратегия, которая сначала дала молчащий нулевой аллель. Более того, в отличие от ситуации с Dlk<sup>-/-</sup> мышами (59), Lzk<sup>-/-</sup> мыши были жизнеспособными и фертильными. Так Lzk<sup>-/-</sup> мышей скрещивали с линией с нокином spCas9 с получением мышей Rosa26Cas9/Cas9Lzk<sup>-/-</sup>, более подходящей линии для подтверждения результатов скрининга раздела 1.

Гены, идентифицированные в разделе 2, могут быть более сложными для подтверждения *in vivo*, так как они, вероятно, потребуют одновременного разрушения множества генов. Для них будет использован небольшой размер конструкции и тот факт, что может быть обеспечен дополнительный H1, управляющий экспрессией другой gRNA, и при этом сохранена та же конструкция scAAV. Это позволит нокаутировать два гена с помощью одного вирусного вектора (подробнее обсуждаемого в разделе 11). В будущей исследовательской работе можно было бы попытаться использовать более двух gRNA (вместо mCherry или в одноцепочечной (ss) AAV конструкции) для нацеливания на сети генов.

9. Используйте модифицированный подход с использованием scAAV2/CRISPR для подтверждения того, что наилучшие результаты скрининга, указанные в разделе 5, не влияют на регенерацию.

Базальные уровни регенерации RGC после раздавливания зрительного нерва чрезвычайно низки, но могут быть повышены путем ингибирования PTEN, но не тогда, когда PTEN и DLK

одновременно ингибируются (6). В качестве одного из подходов для проверки того, способствует ли ингибирование кандидатов, идентифицированных в разделе 5, выживаемости RGC без влияния на регенерацию (в отличие от DLK), получали мышей с нокаутом каждого гена-кандидата, и их скрещивали на *Pten<sup>fl/fl</sup>* фоне - чрезмерное количество времени и усилий. Вместо этого будет использован метод нокаута *in vivo* для конструирования *scAAV*, который экспрессирует *gRNA*, нацеленную на представляющий интерес ген, со стандартного двунаправленного промотора *H1* в направлении *Pol III* и *mCherry* без слияния с *H2B* (для визуализации аксонов) в направлении *Pol III*. Второй промотор *H1* будет экспрессировать *gRNA*, нацеленную на *Pten*. Мышам, экспрессирующим *spCas9*, будут вводить в стекловидное тело одного глаза оптимальную дозу *scAAV2-X gRNA:H1:mCherry; H1:Pten gRNA*, где *X* представляет собой либо *gRNA* без нацеливания (отрицательный контроль для предотвращения регенерации), либо *gRNA*, нацеленную на *Dlk#4* (положительный контроль для предотвращения регенерации), либо *gRNA*, нацеленную на кандидата из раздела 5. Через две недели глаза будут подвергаться в течение трех секунд раздавливанию зрительного нерва (чтобы не нарушать сосудистую сеть). Наконец, еще через две недели зрительные нервы из трех групп ( $n=10$  зрительных нервов на группу) будут собраны, будут сделаны их продольные срезы, и будет количественно определено число *mCherry*-позитивных аксонов, выходящих за пределы места раздавливания.

Если фенотип регенерации, создаваемый делецией *Pten*, будет недостаточным, эффект может быть усилен с помощью *Socs3* (33, 35, 60). Эти эксперименты предлагаются в качестве альтернативы, поскольку в оригинальной работе о роли *DLK* в регенерации использовалась делеция *Pten* (а не комбинация *Pten/Socs3*) (6). Разрушение множества аллелей является амбициозным и может происходить с низкой частотой. К счастью, компактные промоторы *H1* оставляют почти 1 т.о. места для упаковки, даже в случае двух промоторов *H1* и конструкции *scAAV*, что позволяет создавать репортеры на основе флуоресцентных белков для редактирования *CRISPR* (61).

10. Нокаут Dlk в качестве доказательства принципа, что терапевтически подходящий подход, основанный на ssAAV/CRISPR, может быть использован для нацеливания на гены у мышей дикого типа.

Эксперименты, описанные в разделах 7 и 8, используют преимущества надежности scAAV и позволяют быстро подтвердить биологию, но не являются терапевтически применимыми, поскольку они основаны на мыши с нокином spCas9. В качестве дополняющего подхода двунаправленная особенность промотора H1 будет использоваться для управления экспрессией Cas9 и gRNA, что позволяет упаковывать обе кассеты в один вирусный вектор. Хотя стратегия делает возможной вставку, сопоставимую по размеру с AAV дикого типа, она слишком велика для scAAV. Таким образом, частицы ssAAV2-Dlk gRNA:H1:spCas9 будут получены и исследованы, как описано в разделе 7, за исключением того, что животные не будут экспрессировать spCas9 (поскольку теперь она обеспечивается вирусом). Вирус будет исследован на модели глаукомы, и будут включены функциональные показатели зрения. Важно отметить, что, хотя Dlk и RGC были в центре внимания, эти данные могли бы иметь еще более далеко идущие последствия – использование одного вируса AAV/CRISPR для модификации генома и повышения устойчивости к болезненному состоянию.

Процент клеток, подвергающихся биаллельному разрушению, может быть недостаточным для надежного определения увеличения выживаемости в модели раздавливания зрительного нерва. На сегодняшний день приблизительно 20 сайтов-мишеней Dlk были отобраны с использованием модели *in vitro*, и не были обнаружены сайты, которые работают намного лучше, чем #4 (который использовался для раздела 6). Даже моноаллельное разрушение Dlk может увеличить выживаемость, хотя и меньше, чем надежная защита, обеспечиваемая биаллельным разрушением (37). Для сенсibilизации клеток к этому моноаллельному разрушению Dlk эксперимент можно повторить, используя Lzk<sup>-/-</sup> мышей. Дополняющая стратегия будет заключаться в том, чтобы продлить время между раздавливанием зрительного нерва до количественного определения RGC. Хотя эксперимент, как правило, прекращают через две недели

(когда погибает ~75-80% RGC), продолжающаяся потеря происходит в течение следующих 1-2 недель, в конечном итоге достигая плато гибели клеток ~90-95%. Даже если только 5% клеток имеют биаллельное разрушение Dlk, это может привести к относительному увеличению числа выживших клеток, составляющему 50-100%, за один месяц (по сравнению с составляющим 20-25% увеличением за две недели). Наконец, хотя сайт-мишень Dlk#4 является предпочтительным (из-за сайта для BglII), эксперимент можно повторить с #5, который имеет точно такую же последовательность у мышей и людей и, таким образом, позволяет проверять на модели на животных терапевтическое средство для человека.

11. Определите расщепления вне мишени, произведенные терапевтическим средством AAV/CRISPR, разработанным в разделе 10. Хорошо известно, что spCas9 допускает несоответствия больше в той части протоспейсера, которая является дистальной по отношению к PAM (62, 63), таким образом, наиболее вероятные сайты вне мишени имеют консервативную 3' последовательность и 1-2 несоответствия на 5'-конце.

Поскольку сайт для BglII расположен вблизи сайта расщепления (3'), почти все вероятные расщепления вне мишени в случае gRNA #4 сохраняют сайт для BglII. Можно использовать геномную ДНК, полученную в разделе 10, и анализ с использованием BglII, описанный на фиг. 19H, для количественной оценки расщепления в наиболее вероятных сайтах вне мишени.

Несмотря на то, что специфичность *in vitro* (фиг. 19H) является обнадеживающей, расщепление вне мишени может быть проблемой. В этом случае одна из двух недавно описанных совокупностей мутаций (spCas9-NF1-N497A, R661A, Q695A, Q926A; eSpCas9-K810A K103A, R1060A), которая увеличивает специфичность (64, 65), может использоваться в spCas9. Альтернативой может быть проверка другой последовательности gRNA, хотя определение расщепления на мишени и вне мишени должно будет выполняться с помощью более трудоемких методов, вроде анализа с использованием эндонуклеазы T7 и секвенирования. Вариант этой идеи мог бы заключаться в усечении 1-3 нуклеотидов с 5'-конца gRNA #4,

способе, который, как было показано, увеличивает специфичность (66). К счастью, gRNA #4 начинается с GAAG, поэтому любое из этих усечений все еще совместимо с промотором H1 (который иницируется в А или G). Наконец, стоит упомянуть, что экспрессируемые с H1 gRNA могут приводить к более низким скоростям расщепления вне мишени (53).

12. Разработайте терапевтическое средство AAV/CRISPR, которое доставляет Cas9 и две gRNA в одном векторе.

Благодаря использованию промотора H1 размер Dlk gRNA:H1:spCas9 составляет 4,5 т.о., что значительно меньше размера вируса дикого типа=4,7-4,8 т.о. и предела упаковки AAV=5,2 т.о. Это дает возможность модифицировать конструкцию, предложенную в разделе 10, с помощью дополнительной кассеты H1-gRNA (~0,2 т.о.). Экспрессия двух gRNA из одного вируса (в дополнение к spCas9) открывает несколько возможностей, в том числе использование более специфичного мутанта «никазы» spCas9 (67), образование больших делеций в одном гене и, что имеет отношение к теме работы авторов настоящего изобретения, одновременное нацеливание на два компенсаторных гена. Чтобы проверить это, H1:Lzk gRNA #1 будет добавлена в экспрессионную кассету, конструкцию, описанную в разделе 10, и будут получены вирусные частицы ssAAV2-Dlk gRNA4:H1:spCas9; H1:Lzk gRNA5. Они будут исследованы, как описано в разделе 10, на этот раз сравнивая вирусы, которые нацелены на Dlk отдельно или в комбинации с Lzk (n=10 сетчаток на группу).

Размер этой конструкции раздвигает предел пакующей емкости AAV (хотя остается на менее чем 0,1 т.о. больше размера вируса дикого типа). Если это становится проблемой, можно использовать меньший промотор H1 мыши (который также функционирует в двух направлениях) или saCas9, которая почти на 1 т.о. меньше spCas9 (52). Последний подход потребует других сайтов-мишеней, так как ни сайт #4, ни сайт #5 не совместимы с требованием к PAM для saCas9.

13. Изучите механизм, с помощью которого DLK регулирует MEФ2A, чтобы способствовать гибели клеток RGC.

MEF2A играет хорошо изученную роль в мышечной дифференцировке и физиологии сердечнососудистой системы (68). В нейронах, как было установлено, MEF2A играет важную роль в способствовании выживаемости (27), и хотя специфический для головного мозга условный нокаут *Mef2a* не влияет на общую выживаемость нейронов, совместный нокаут *Mef2a/c/d* демонстрирует явное увеличение апоптоза нейронов, приводящего к ранней постнатальной смертности (30). В ответ на эксайтотоксические стимулы нейроны коры головного мозга используют два механизма для ингибирования передачи сигналов от MEF2A и стимулирования апоптоза: катализируемое каспазой расщепление MEF2A, которое приводит к доминантно-негативной активности (69), и фосфорилирование циклин-зависимой киназой 5 (CDK5) в S408 MEF2A, что приводит к инактивации трансактивирующего домена (70) или, особенно в случае физиологии дендритных синапсов, последующему сумоилированию в K403 и образованию транскрипционно-репрессивной формы MEF2A (29, 71). В каждом из этих случаев MEF2A способствует выживаемости нейронов, а ингибирование MEF2A приводит к гибели клеток. В противоположность, MEF2A был идентифицирован в качестве медиатора гибели клеток RGC *in vitro* и *in vivo* (фиг. 20F и 20G). Когда выживаемость RGC с *Mef2a*, фланкированным loxP-сайтами, сравнивали с таковой RGC с *Mef2a/c/d*, фланкированными loxP-сайтами, (30), различий не наблюдалось (не представленные данные), что свидетельствует о том, что MEF2A не пересекался с MEF2C/D в способствовании гибели клеток RGC. Наконец, хотя и устойчивое, DLK-зависимое фосфорилирование в S408 MEF2A было обнаружено в ответ на повреждение зрительного нерва *in vivo* или иммунопэннинг *in vitro*, нефосфорилируемый мутант S408A не влияет на активность (фиг. 201). Вместе эти результаты предполагают, что активация DLK приводит к новым изменениям в MEF2A, которые ответственны за гибель клеток.

14. Используйте протеомный подход для идентификации DLK-зависимых посттрансляционных модификаций MEF2A.

Для определения механизма, с помощью которого DLK/LZK регулирует MEF2A, MEF2A очищали из первичных RGC с *Dlk/Lzk*,

фланкированным loxP-сайтами, трансдуцированных адено-Cre (для отсечения передачи сигналов от DLK/LZK), адено-GFP (которые имеют активную передачу сигналов от DLK/LZK), DLK крысы дикого типа (которая сверхактивирует путь) или DLK крысы с неработающей киназой (который функционирует как доминантно-негативный). Фосфорилированные остатки и относительная степень фосфорилирования в каждом из этих сайтов будет определяться с помощью количественного анализа с использованием химических меток для тандемной масс-спектрометрии (TMT, Thermo Scientific) и анализа с помощью тандемной масс-спектрометрии с жидкостной хроматографией (LC-MS/MS) на одном из нескольких масс-спектрометров Orbitrap (Thermo Scientific), доступных группе авторов настоящего изобретения. Этот подход также позволяет анализировать другие посттрансляционные модификации, вроде сумоилирования и ацетилирования, которые, как уже известно, играют роль в передаче сигналов от MEK2A (29, 71). Изменения, которые появляются в зависимости от присутствия DLK/LZK, и особенно те, которые увеличиваются с усилением активности пути, будут рассмотрены в разделе 15.

Самой большой проблемой может быть количество исходного материала, учитывая, что посттрансляционные модификации MEK2A будут анализироваться в контексте соответствующей заболеванию системе первичных клеток авторов настоящего изобретения. Чтобы обойти эту проблему, обычно можно выделить 3-5000000 RGC, чего должно быть более чем достаточно, учитывая небольшую сложность IP (т.е. рассматривая только один белок). Если белка MEK2A может быть получено недостаточно, может быть использована сверхэкспрессия MEK2A с эпитопной меткой. Во-вторых, чувствительность и точность анализа MS можно повысить с помощью подходов к множественному мониторингу реакций (MRM), нацеленных на потенциальные сайты фосфорилирования MEK2A - как известные, так и неизвестные - после первой оптимизации анализа MRM для этих видов (72, 73). Если фосфорилирование одновременно во множестве сайтах является важным для регуляции MEK2A с помощью DLK/LZK, нисходящий протеомный подход может быть использован для интактного не трипсинизированного MEK2A, чтобы определить

множественность фосфорилирования.

15. Используйте комбинацию мутаций и экспериментов с усилением функции/потерей функции для проверки протеомически идентифицированных посттрансляционных модификаций.

Посттрансляционные модификации, указанные в разделе 14, будут проверены в системе первичных RGC. Мутанты для каждого из остатков (например, S408A) будут встроены в кДНК для Mef2a мыши и перенесены в аденовирусный вектор, как многократно описано выше. Затем RGC будут выделены из мыши с Mef2a, фланкированным loxP-сайтами, и трансдуцированы аденовирусом-Cre (MOI (множественность заражения)=1000), для способствования выживаемости и удаления эндогенного MEF2A. Через 48 часов аденовирус будет использоваться для повторного введения MEF2A дикого типа или немодифицируемых мутантов. Если посттрансляционная модификация является необходимой для MEF2A-зависимого уничтожения, ожидается, что мутант потеряет функцию. Кроме того, сверхэкспрессия DLK дикого типа (которая сверхактивирует путь и ускоряет гибель клеток RGC) будет использоваться в сочетании с мутантами, чтобы понять, обладают ли они доминантно-негативной активностью (т.е. как бы следовало ожидать, если бы модификации были частью механизма, посредством которого передача сигналов от DLK активирует MEF2A). Наконец, по меньшей мере, в случае с фосфозитами, будут разработаны фосфомиметические мутации (например, S408E), и будет проверено, усиливают ли они конститутивную активность и способствуют ли гибели клеток даже в условиях совместного ингибирования DLK/LZK (с использованием siRNA).

16. Используйте стратегию CRISPR/AAV для проверки того, способствует ли целенаправленное разрушение Mef2a *in vivo* выживаемости RGC без влияния на регенерацию аксонов.

Хотя DLK играет ключевую роль как в гибели клеток, так и в регенерации аксонов, были идентифицированы четыре нижерасположенных фактора транскрипции, которые опосредуют передачу сигнала о гибели клеток. Хотя по меньшей мере два из них (т.е. SOX11 и JUN) играют известные роли в регенерации, роль MEF2A неизвестна. Таким образом, MEF2A мог бы потенциально

представлять нейропротективную мишень, которая разъединяет выживаемость и регенерацию. Действительно, *in vitro* нокдаун MEF2A, по-видимому, не оказывает серьезного влияния на рост аксонов (не представленные данные). Вообще-то, это направление исследований будет иметь ограниченную применимость, поскольку MEF2A, являясь фактором транскрипции, нелегко поддается лечению лекарственным средством. Однако стратегия, изложенная в разделе 10, позволяет превращать гены, вроде MEF2A, в терапевтические мишени. Более того, описанный в разделе 9 подход, в котором множество генов было подвергнуто нокауту, и даже селективно помечены клетки с редактированием с помощью активной CRISPR, дает возможность легко исследовать биологию MEF2A *in vivo*. Таким образом, мыши с нокином spCas9-2A-GFP будут трансдуцированы описанным в разделе 9 вирусом, модифицированным для нацеливания на Mef2a, Dlk (положительный контроль для предотвращения регенерации), или контролем без нацеливания (отрицательным контролем для предотвращения регенерации), и проанализированы, как описано в разделе 9.

#### *ЗАКЛЮЧЕНИЕ*

Вкратце, здесь описаны серии экспериментов, направленных на дальнейшее изучение действующего до или после действия DLK/LZK механизма, с помощью которого DLK и LZK способствуют гибели клеток RGC. Кроме того, с использованием терапии CRISPR/AAV была разработана платформа, которая позволяет проводить быструю валидацию *in vivo* и, что наиболее важно, плавно переходить к высокоспецифичной терапии на основе генной терапии. В самом деле, несмотря на огромное волнение по поводу основанных на CRISPR терапиях для редактирования генома, эта область ограничивается тем фактом, что spCas9 и gRNA не могут быть одновременно упакованы в один вирусный вектор. Используя промотор H1, это препятствие было преодолено. Используя DLK в качестве примера, модификация генома может быть использована терапевтически при нейропатиях зрительного нерва.

*Мишени:*

**DLK**

экзон 1:

mm048414154: AGGTCCAGGATTTCTCAAAGGG (SEQ ID NO:143)  
 mm048414155: ATCTAGAGTTCGAGCTGATGAGG (SEQ ID NO:144)  
 mm048414202: GTGGGCGTCAGGTCTTTCTCGGG (SEQ ID NO:145)  
 экзон2  
 mm048414070: ACTTGAAAGTGATGATGTTGGGG (SEQ ID NO:146)  
 mm048414079: GAAGAAGGTTCGAGATCTCAAGG (SEQ ID NO:147)  
 mm048414081: GGAGGAGGTAGCTGTGAAGAAGG (SEQ ID NO:148)  
 mm048414082: GGGACGCTTCCACGGGGAGGAGG (SEQ ID NO:149)  
 mm048414086: GTTTTCTGGGACGCTTCCACGG (SEQ ID NO:150)  
 mm048414094: AGGTCCAGGATTTCTCAAAGGG (SEQ ID NO:151)

**LZK**

экзон1:

mm049598783: ACGAAATGAGCTTGCAGCTATGG (SEQ ID NO:152)  
 mm049598824: GTGGATGGAGAGAACACGAACGG (SEQ ID NO:153)  
 mm049598832: GGCAGCGGCGGGTTTCTCGAAGG (SEQ ID NO:154)  
 mm049598833: GGGTTTCTCGAAGGACTGTTTGG (SEQ ID NO:155)

экзон2

mm049599350: AGGAAATCTCAGAGCTGCAATGG (SEQ ID NO:156)  
 mm049599375: GCAAGTGCCGACCTACTTGAAGG (SEQ ID NO:157)  
 mm049599764: GACCTCGTACAGCTGTCCGTGGG (SEQ ID NO:158)  
 mm049599772: GCAGCCGGGGCGTGATCTTCCGG (SEQ ID NO:159)  
 mm049599878: GGATGGCACCAGAGGTGATCCGG (SEQ ID NO:160)  
 mm049599881: GATCCGGAATGAGCCTGTCTCGG (SEQ ID NO:161)  
 mm049599884: GGCTCATTCGGATCACCTCTGG (SEQ ID NO:162)

**Пример 5****Протоколы**

Клетки HEK293 засевают в матрасы T25 и выращивают до полуконфлюэнтности в DMEM, дополненной 10% фетальной телячьей сывороткой и антибиотиками. Через два дня после посева клетки в одной матрасе трансфицируют плазмидой pAAV-SEP290. Смесь для трансфекции, содержащую 4 мкг плазмидной ДНК, 20 мкл липофектамина 3000 (ThermoFisher/Invitrogen) и 10 мкл реагента P3000 (ThermoFisher/Invitrogen) в общем объеме 500 мкл среды OptiMEM, не содержащей добавок, добавляют в среду для культивирования клеток. Клетки во второй матрасе инфицируют 100 мкл упакованного и очищенного запаса AAV2-SEP290 ( $2,06 \times 10^{11}$

вирусных геномов). Третий матрас T25 не обрабатывали и использовали в качестве контроля. Клетки собирали в трипсин-EDTA через 48 ч после трансфекции или инфекции и осаждали с помощью центрифугирования. Для каждого образца клеточный осадок ресуспендировали в 200 мкл PBS и обрабатывали с использованием мини набора для ДНК Qiagen в соответствии с протоколом производителя. Геномную ДНК элюировали в 200 мкл воды.

Для анализа с использованием Endo I T7, геномную ДНК экстрагировали путем ресуспендирования клеток в растворе QuickExtract (Epicenter, Madison, WI), инкубируя при 65°C в течение 20 минут, а затем при 98°C в течение 20 минут. Раствор экстракта использовали непосредственно или очищали с использованием DNA Clean and Concentrator (Zymo Research, Irvine, CA) и количественно оценивали с помощью NanoDrop (Thermo 30 Fisher Scientific). Геномную область, окружающую сайт-мишень для CRISPR, амплифицировали из ~100 нг геномной ДНК, используя ДНК-полимеразу Phusion (New England Biolabs). Множество независимых реакций ПЦР объединяли и очищали с использованием DNA Clean and Concentrator (Zymo Research, Irvine, CA). Объем 25 мкл, содержащий 150 нг продукта ПЦР в 10 мМ Трис-HCl, 50 мМ NaCl, 10 мМ MgCl<sub>2</sub> и 100 мкг/мл BSA, денатурировали и медленно подвергали повторному отжигу для допуска образования гетеродуплексов: 95°C в течение 10 мин, от 95°C до 85°C со скоростью изменения температуры -1,0°C/с, 85°C в течение 1 с, от 85 до 75°C со скоростью -1,0°C/с, 75°C в течение 1 с, от 75 до 65°C со скоростью -1,0°C/с, 65°C в течение 1 с, от 65°C до 55°C со скоростью -1,0°C/с, 55°C в течение 1 с, от 55 до 45°C со скоростью -1,0°C/с, 45°C в течение 1 с, от 45°C до 35°C со скоростью -1,0°C/с, 35°C в течение 1 с, от 35°C до 25°C со скоростью -1,0°C/с, и затем выдерживали при 4°C. К каждой реакции добавляли 1 мкл EndoI T7 (New England Biolabs), инкубировали при 37°C в течение 30 минут и затем сразу же помещали на лед. Для анализа в геле 3 мкл реакционной смеси смешивали с 3 мкл 2х загрузочного красителя (New England Biolabs), вносили в 6% ТВЕ-

ПААГ для электрофореза и окрашивали SYBR Gold (1:10000) в течение ~15 минут до визуализации. Гели визуализировали в системе формирования изображений Gel Logic 200 (Kodak, 15 Rochester, NY) и количественно оценивали с использованием ImageJ v. 1.46. Частоты NHEJ рассчитывали с использованием биномиального уравнения:

$$\% \text{ модификации гена} = 100 * (1 - (\text{SQRT}(1 - ((a+b)/(a+b+c))))))$$

где значения «а» и «b» равны суммарной площади расщепленных фрагментов после вычитания фона, а «с» равен суммарной площади нерасщепленного продукта ПЦР после вычитания фона.

Для рестрикционного анализа геномную ДНК экстрагировали путем ресуспендирования клеток в растворе QuickExtract (Epicenter, Madison, WI), инкубируя при 65°C в течение 20 минут, а затем при 98°C в течение 20 минут. Раствор экстракта использовали непосредственно или очищали с использованием DNA Clean and Concentrator (Zymo Research, Irvine, CA) и количественно оценивали с помощью NanoDrop (Thermo 30 Fisher Scientific). Геномную область, окружающую сайт-мишень для CRISPR, амплифицировали из ~100 нг геномной ДНК, используя ДНК-полимеразу Phusion (New England Biolabs). Множество независимых реакций ПЦР объединяли и очищали с использованием DNA Clean and Concentrator (Zymo Research, Irvine, CA). Объем 25 мкл, содержащий 150 нг продукта ПЦР в 10 мМ Трис-НСl, 50 мМ NaCl, 10 мМ MgCl<sub>2</sub> и 100 мкг/мл BSA,, расщепляли при 37°C в течение 1 часа. Для анализа в геле 3 мкл реакционной смеси смешивали с 3 мкл 2х загрузочного красителя (New England Biolabs), вносили на 6% ТВЕ-ПААГ для электрофореза и окрашивали SYBR Gold (1:10000) в течение ~15 минут до визуализации. Гели визуализировали в системе формирования изображений Gel Logic 200 (Kodak, 15 Rochester, NY) и количественно оценивали с использованием ImageJ v. 1.46. Частоты NHEJ рассчитывали с использованием уравнения:

$$\% \text{ модификации гена} = ((a+b)/(a+b+c)) * 100$$

где значения «а» и «b» равны суммарной площади расщепленных фрагментов после вычитания фона, а «с» равен суммарной площади нерасщепленного продукта ПЦР после вычитания фона.

Врожденный амавроз Лебера (LCA) состоит из группы дистрофий сетчатки в раннем детском возрасте, которые характеризуются тяжелым нарушением функции сетчатки и серьезными нарушениями зрения или слепотой в течение первых месяцев жизни. LCA, редкое заболевание, является самой распространенной причиной наследственной слепоты, составляющей до 5% всех известных наследственных дегенеративных заболеваний сетчатки. Самой частой причиной LCA10 - заболевания, для которого не существует одобренной FDA терапии - является глубокая интронная мутация в гене CEP290 (den Hollander, A. I. et al. (2006) *American journal of human genetics* **79**, 556-561) (фиг. 51). Мутация IVS26 c.2991+1655 A→G приводит к созданию сильного сайта донора сплайсинга de novo и последующему включению криптического экзона (экзона X) в мРНК для CEP290. CEP290, centrosomal белок, находящийся в соединительной цилии фоторецепторов, играет роль в цилиогенезе и миграции цилиарных белков (Drivas, T. G. et al. (2013) *The Journal of clinical investigation* **123**, 4525-4539; Craige, B. et al. (2010) *The Journal of cell biology* **190**, 927-940; Tsang, W. Y. et al. (2008) *Developmental cell* **15**, 187-197). Включение экзона X, который содержит преждевременный стоп-кодон, приводит к усеченной форме CEP290 и дегенерации фоторецепторов в конце концов.

Некоторые формы LCA потенциально поддаются лечению рекомбинантными аденоассоциированными вирусами (AAV), сконструированными для доставки функциональной копии дефектного клеточного гена. В 2008 году трансген, который комплементировал мутацию в RPE65, был успешно доставлен с помощью AAV пациентам с LCA2 в фазе I клинического испытания (Maguire, A. M. et al. (2008) *The New England journal of medicine* **358**, 2240-2248). Некоторые ответные реакции были отмечены, но, к сожалению, эффекты не были длительными, возможно, из-за утраты экспрессии трансгена (Azvolinsky, A. (2015) *Nat Biotechnol* **33**, 678; Schimmer, J. et al. (2015) *Human gene therapy. Clinical development* **26**, 208-210). Кроме того, мутации в некоторых генах, которые вызывают различные подтипы LCA, таких как CEP290, просто

слишком велики для доставки с помощью AAV и поэтому остаются не поддающимися лечению с помощью способов генной терапии. Кроме того, фоторецепторы являются очень чувствительными к уровням белка (Olsson, J. E. *et al.* (1992) *Neuron* **9**, 815-830; Tan, E. *et al.* (2001) *Investigative ophthalmology & visual science* **42**, 589-600; Seo, S. *et al.* (2013) *Investigative ophthalmology & visual science* **54**, и трансгенные эксперименты продемонстрировали токсичность по отношению к фоторецепторам при сверхэкспрессии CEP290 (Burnight, E. R. *et al.* (2014) *Gene therapy* **21**, 662-672). Учитывая следующие свойства, авторы настоящего изобретения полагают, что мутация в CEP290 является особенно привлекательной в качестве терапевтической мишени для технологии на основе CRISPR-Cas9.

Развитие технологии на основе CRISPR-Cas9 произвело революцию в области редактирования генов и предлагает совершенно новый подход к лечению генетических заболеваний. Система CRISPR-Cas9 состоит из РНК-проводника (gRNA), которая направляет нуклеазу Cas9 специфическим для последовательности образом. Расщепление с помощью системы CRISPR требует комплементарного спаривания оснований gRNA с последовательностью ДНК и необходимым, прилегающим к протоспейсеру мотивом (PAM), коротким нуклеотидным мотивом, находящимся 3' от сайта-мишени (Doudna, J. A. *et al.* (2014) *Science* **346**, 1258096; Hsu, P. D. *et al.* (2014) *Cell* **157**, 1262-1278). В настоящее время наименее ограничивающий и наиболее часто используемый белок Cas9, который распознает последовательность NGG, происходит от *S. pyogenes*, и, таким образом, последовательностью-мишенью для CRISPR является N<sub>20</sub>NGG. Хотя многочисленные исследования показали, что мутации, вызывающие заболевания, могут быть эффективно превращены в мишени *in vitro*, разработка основанных на CRISPR-Cas9 терапевтических средств для применения *in vivo* затруднена проблемами безопасности и ограничениями при доставке.

Хотя с помощью исследований на мышах и других животных было показано, что нацеливание CRISPR на вызывающие заболевания мутации эффективно в многочисленных условиях *in vitro*, а также *in vivo*, все существующие подходы все еще далеки от клинического

применения, в значительной степени из-за ограничений при доставке. AAV векторы являются наиболее часто и успешно используемыми вирусными векторами при инъекциях для генной терапии глазных болезней (Dalkara, D. et al. (2014) *Comptes rendus biologiques* **337**, 185-192; Day, T. P. et al. (2014) *Advances in experimental medicine and biology* **801**, 687-693; Willett, K. et al. (2013) *Frontiers in immunology* **4**, 261; Dinculescu, A. et al. (2005) *Human gene therapy* **16**, 649-663). Несколько особенностей делают AAV наиболее привлекательным выбором: вирус является непатогенным, он инфицирует как делящиеся, так и неделящиеся клетки, экспрессия может сохраняться в течение длительных периодов времени, и особенно заслуживает внимания информация о его безопасности, эффективности и общем отсутствии токсичности в клинических испытаниях. Кроме того, определенные серотипы AAV эффективны для нацеливания на фоторецепторные клетки после субретинальной инъекции. Хотя AAV векторы обеспечивают безопасное средство доставки терапевтических компонентов CRISPR, существует одно важное техническое препятствие, ограничивающее их применимость - их размер. Размер геномов AAV дикого типа составляет ~4,7 т.о., и рекомбинантные вирусы могут упаковывать до ~5,0 т.о. (Dong, B. et al. (2010) *Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy* **18**, 87-92; Wu, Z. et al. (2010) *Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy* **18**, 80-86). Эта пакующая емкость определяет верхний предел ДНК, который можно использовать для одного вирусного вектора.

Размер ДНК, необходимой для экспрессии Cas9 и gRNA, общепринятыми методами, превышает 5,2 т.о.: промотор Pol II (~0,5 т.о.), SpCas9 (~4,1 т.о.), терминатор Pol II (~0,2 т.о.), промотор U6 (~0,3 т.о.) и gRNA (~0,1 т.о.). Одним из подходов к проблеме доставки AAV является двухвекторный подход: один AAV вектор для доставки Cas9, а другой AAV вектор для gRNA (Swiech, L. et al. (2015) *Nat Biotechnol* **33**, 102-106). Однако в подходе с использованием двух AAV используется небольшой промотор Mesp2 мыши, гена, который, как было установлено, экспрессируется в

клетках сетчатки, за важным исключением палочек (Song, C. *et al.* (2014) *Epigenetics & chromatin* 7, 17; Jain, D. *et al.* (2010) *Pediatric neurology* 43, 35-40) - что говорит о том, что, помимо потенциальной токсичности из-за увеличения нагрузки доставки на вирус, подход с использованием совместной доставки, скорее всего, не сможет быть нацелен на подавляющее большинство мутаций LCA априори. Несмотря на то, что это потенциально жизнеспособный подход для редактирования генома с использованием другой генной терапии, авторы настоящего изобретения вместо этого предлагают подход с использованием одного вектора для редактирования генов сетчатки, который должен увеличить эффективность, быть нацелен специфически на фоторецепторы и снизить потенциальную токсичность от доставки вирусной массы.

Недавно авторы настоящего изобретения сообщили, что использование промотора H1, а не более традиционно используемого промотора U6, для управления транскрипцией gRNA позволяет увеличить приблизительно вдвое доступное место для нацеливания CRISPR на ген (Ranganathan, V. *et al.* (2014) *Nature communications* 5, 4516). Примечательно, что авторы настоящего изобретения также обнаружили меньшую склонность к расщеплению вне мишени, что свидетельствует о том, что промотор H1 будет более подходящим для терапевтических подходов. Во время этих исследований авторы настоящего изобретения заметили присутствие кодирующего белок гена (PARP-2) в непосредственной геномной близости от эндогенного гена H1RNA (Myslinski, E. *et al.* (2001) *Nucleic Acids Res* 29, 2502-2509; Baer, M. *et al.* (1990) *Nucleic Acids Res* 18, 97-103). Последовательность между началом H1RNA (РНК-транскрипт pol III) и геном PARP-2 (транскрипт pol II) составляет 230 п.о. (фиг. 52), что указывает на то, что эта относительно небольшая последовательность может функционировать в качестве компактного двунаправленного промотора - т.е., насколько известно авторам настоящего изобретения, единственной двунаправленной промоторной последовательности в геномах млекопитающих, которая может управлять транскрипцией как pol II, так и pol III. Авторы настоящего изобретения предположили, что эти неожиданные свойства промотора H1 могут позволить преодолеть

связанные с размером барьеры для упаковки обоих компонентов CRISPR в один AAV.

Авторами настоящего изобретения будут разработаны два терапевтических средства CRISPR/AAV параллельно на основе ортогональных систем Cas9. Во-первых, это разработка терапевтического средства для LCA10 с использованием совместной доставки SpCas9 и РНК-проводника благодаря одному вектору AAV. Во-вторых, это разработка терапевтического средства для LCA10 с использованием совместной доставки Cas9 и четырех РНК-проводников благодаря одному вектору AAV. Обе стратегии разрабатываются для возможного клинического применения, и поэтому безопасность имеет первостепенное значение. Наконец, авторами настоящего изобретения будут созданы изогенные линии стволовых клеток человека, содержащие LCA10, для характеристики и разработки новых терапевтических средств.

**Разработка терапевтического средства для LCA10 с использованием совместной доставки Cas9 *S. pyogenes* (SpCas9) и РНК-проводника благодаря одному AAV вектору.**

**Предпосылки и обоснование.** Хотя многочисленные исследования показали, что вызывающие заболевания мутации могут быть эффективно превращены в мишени *in vitro*, разработка терапевтических средств на основе SpCas9 для применения *in vivo* была затруднена из-за ограничений при доставке. Используя компактную двунаправленную промоторную систему, авторы настоящего изобретения продемонстрировали клинически жизнеспособную платформу для совместной доставки SpCas9 и gRNA благодаря одному AAV вектору. SpCas9 дает несколько преимуществ: это наиболее часто используемая, наиболее универсальная и наиболее понятная система CRISPR. Ее требование к PAM (NGG) значительно менее строгое, чем у других белков Cas9, что, в свою очередь, означает, что на большее количество генов и мутаций можно напрямую нацеливаться. Что важно для клинических терапевтических подходов, последние достижения в области белковой инженерии SpCas9 позволили разработать множество вариантов высокой специфичности/высокой точности с минимальными обнаруживаемыми эффектами вне мишени по всему геному

(Kleinstiver, B. P. et al. (2016) *Nature* doi:10.1038/nature16526; Slaymaker, I. M. et al. (2016) *Science* 351, 84-88). Действительно, в отличие от других сайтов нацеливания ортологов Cas9, интронная мутация в CEP290 находится в сайте SpCas9 (фиг. 53), что делает вызывающую LCA10 мутацию особенно привлекательной мишенью для SpCas9.

Адаптируя последовательность gRNA к конкретным применениям, авторы настоящего изобретения могут направить SpCas9 (или вариант SpCas9) на мутацию в CEP290, вызывая двухцепочечный разрыв ДНК вблизи сайта донора сплайсинга. Клеточный ответ на разрывы ДНК происходит главным образом через один из двух конкурирующих путей: негомологичное соединение концов (NHEJ) или гомологичную репарацию (HDR). NHEJ, более доминирующий путь репарации ДНК, является подверженным ошибкам путем, который приводит к делециям и вставкам вблизи точки разрыва, обычно +/- ~15 нуклеотидов (Mali, P. et al. (2013) *Science* 339, 823-826). Таким образом, используя обычный механизм репарации ДНК клеток, авторы настоящего изобретения могут разрушить последовательности вблизи сайта донора сплайсинга, предотвратить включение экзона X и восстановить нормальный сплайсинг и функцию CEP290. Важно отметить, что многие мутации в этой интронной области, как ожидается, будут восстанавливаться при нормальном сплайсинге.

Подход авторов настоящего изобретения будет включать модификацию и оптимизацию методологии CRISPR-Cas9, чтобы все необходимые компоненты могли быть доставлены в фоторецепторы с помощью одного AAV5, серотипа AAV с документированной эффективностью в палочках млекопитающих. Сменив Cas9 на GFP при использовании системы N1-AAV авторов настоящего изобретения, они смогли продемонстрировать эффективную доставку GFP в фоторецепторы, используя AAV5 (фиг. 2). Поскольку LCA10 является рецессивным, спасение 50% от нормального сплайсинга CEP290 должно быть достаточной для функционирования фоторецептора.

#### **Экспериментальный дизайн и методы.**

**1. Компьютерный метод отбора и анализа gRNA.** Поскольку конструкции разрабатываются с целью возможного клинического

применения, важно тщательно контролировать их на предмет потенциальной активности вне мишени (Wu, X. et al. (2014) *Quantitative biology* 2, 59-70). Для этой цели будем использоваться несколько взаимодополняющих подходов. Используя биоинформационный подход, авторы настоящего изобретения определили все потенциальные сайты для CRISPR в геноме человека, используя собственный скрипт Perl, написанный для поиска как цепей, так и перекрывающихся случаев сайта-мишени для SpCas9; например, в геноме человека после отфильтровывания повторяющихся последовательностей имеется 137409562 сайтов для CRISPR. Авторы настоящего изобретения определили с помощью компьютера склонность каждого сайта к проявлению эффектов вне мишени, используя Bowtie (Langmead, B. et al. (2009) *Genome biology* 10, R25), для переориентации каждого сайта для CRISPR обратно на геном, допуская до 3 несоответствий оснований на протяжении всей последовательности для нацеливания. Анализ сайта для SpCas9 в LCA10 определяет 13 потенциальных локусов вне мишени, которые будут исследоваться на ложное нацеливание: 1 сайт с 2 несоответствиями и 12 сайтов с 3 несоответствиями (расчетные данные доступны на <http://crispr.technology>). Праймеры для ПЦР, фланкирующие сайты на мишени и прогнозируемые сайты вне мишени, будут использоваться с высокоточной полимеразой (NEB, Phusion) для амплификации геномной последовательности, которая затем будет проверена с помощью анализа с использованием T7EI. Это позволит отслеживать точность нацеливания в экспериментах по оптимизации авторов настоящего изобретения как *in vitro*, так и *in vivo*.

**2. Оценка *in vitro* в линиях клеток человека.** Авторы настоящего изобретения разработали несколько плазмид для нацеливания SpCas9, которые содержат уникальный сайт рестрикции для простой вставки gRNA и фланкирующие сайты NotI, что позволяет легко субклонировать в вектор, содержащий ITR, необходимый для продукции AAV. Кроме того, авторы настоящего изобретения создадут конструкции, содержащие два недавно представленных высокоточных варианта Cas9 SpCas9-HF и eSpCas9<sub>26,27</sub> (фиг. 54). Авторы настоящего изобретения не знают о

каких-либо сравнениях между этими вариантами, и минимизация мутагенеза вне мишени имеет первостепенное значение для разработки безопасных терапевтических средств. Для обеспечения эффективного нацеливания в каждом сайте сначала будет проанализирован сайт-мишень для SpCas9 на расщепление в клетках HEK293. Используя ПЦР-праймеры, фланкирующие сайт-мишень, будет использоваться высокоточная полимеразы (NEB, Phusion) для амплификации геномной последовательности, которая затем будет исследована на активность расщепления с помощью анализа с использованием T7EI (подробные протоколы доступны на <http://crispr.technology>).

**3. Высокопроизводительное секвенирование для мутагенеза на мишени/вне мишени.** Авторы настоящего изобретения намерены выполнить сайт-специфическое глубокое секвенирование сайтов на мишени и сайтов вне мишени. Геномные последовательности, фланкирующие сайт-мишень для CRISPR и предполагаемые сайты вне мишени, будут амплифицированы с использованием высокоточной полимеразы (NEB, Phusion) в течение 15 циклов, а затем очищены (Zymo, DNA Clean & Concentrator-5). Очищенные продукты ПЦР будут амплифицированы в течение 5 циклов для присоединения адаптеров Illumina P5 и специфичных для образца «штрих-кодов», снова очищены, а затем количественно оценены по зеленой флуоресценции SYBR, проанализированы на биоанализаторе и, наконец, объединены в эквимольном соотношении перед секвенированием с помощью MiSeq Personal Sequencer. Для анализа данных секвенирования MiSeq-прочтения спаренных концов размеров 300 п.о. будут демультимплексированы с использованием программного обеспечения Illumina MiSeq Reporter с последующей адаптацией и подгонкой качества необработанных прочтений. Совмещения будут выполняться для всех прочтений с последовательностью дикого типа, и частота HEJ будет рассчитываться следующим образом:  $100 * \left( \frac{\text{число прочтений вставок-делеций}}{\text{число прочтений вставок-делеций} + \text{число прочтений WT}} \right)$ .

**4. Продукция AAV вектора.** GMP-подобный преклинический AAV5 вектор с высоким титром будет сконструирован одним из сотрудников (Dr. William Hauswirth, University of Florida) в

независимой лаборатории по получению векторов, используя способ трансфекции плазмидой без использования хелпера, разработанного этой лабораторией. Векторы очищают центрифугированием в градиенте йодиксанола с последующей жидкостной хроматографией быстрого разрешения на Q-колонке, и для установления GLP-подобной степени чистоты запасов AAV векторов, каждый вектор будет подвергаться стандартизированной группе физических и биологических анализов, включая оценку степени чистоты, бионагрузки, стерильности, титра ДНК-содержащих частиц, инфекционного титра, отношения количества частиц к инфективности и потенциального загрязнения компетентным по репликации AAV, каждый из которых является важным элементом для раздела клинических испытаний IND CMC.

**Разработка терапевтического средства для LCA10 с использованием совместной доставки нуклеазы Cas9 *S. aureus* (SaCas9) и четырех РНК-проводников благодаря одному AAV вектору.**

**Предпосылки и обоснование.** Другим многообещающим подходом, который недавно появился для доставки CRISPR с помощью AAV, является использование меньших ортогональных белков Cas9, с выделением Cas9 *S. aureus* (SaCas9), который кодируется транскриптом размером ~3,2 т.о. (Ran, F. A. et al. (2015) *Nature* 520, 186-191). Однако одно ограничение в использовании SaCas9 обусловлено его требованием к PAM (NNGRRT). Число уникальных сайтов-мишеней для него в геноме приблизительно в 4 раза меньше, чем для SpCas9, из-за более длинной последовательности PAM, и нет сайтов для SaCas9, которые попадают в мутацию A→G, вызывающую LCA10. SpCas9 не может быть направлена на эту специфическую мутацию (как описано выше), поэтому подход авторов настоящего изобретения заключается в использовании делеционной стратегии для удаления небольшой области, окружающей криптоический экзон. Компактный размер гена SaCas9 позволяет упаковывать его в один AAV вектор вместе с одной, двумя или, возможно, тремя кассетами для gRNA с использованием стандартных промоторных и терминаторных элементов. С точки зрения безопасности основанных на CRISPR терапевтических средств

наиболее значимым является, несомненно, мутагенез вне мишени; он может произойти, если Cas9 расщепит ДНК в непредусмотренном месте. К счастью, этот риск можно уменьшить на несколько порядков, используя точечную мутацию Cas9, известную как никаза, которая расщепляет только одну цепь ДНК. Отдельно задействуя две gRNA для образования двух близко расположенных друг против друга ников на противоположных цепях, подход с использованием никазы Cas9 может эффективно создавать двухцепочечный разрыв (фиг. 55). Эффекты вне мишени могут возникнуть, только если две gRNA распознают сайты вне мишени, которые встречаются в непосредственной близости и на противоположных цепях в других местах генома, что статистически очень маловероятно. По этой причине использование никазы для создания разрыва ДНК является наиболее безопасным подходом. Что касается создания делеции, этот подход требует четырех gRNA (пару на каждой стороне для удаления целевой мутации). Однако, используя H1-двунаправленную систему, которая обеспечивает дополнительное место, авторы настоящего изобретения смогут легко разместить четыре gRNA.

#### **1. Компьютерный метод отбора gRNA и создание конструкции.**

Как и в случае с биоинформатикой, описанной выше, авторы настоящего изобретения идентифицировали каждый сайт нацеливания SaCas9 в геноме, и занесли информацию в базу данных (данные доступны на <http://crispr.technology>). Для таргетинга делеции, используя систему с никазой SaCas9, авторы настоящего изобретения идентифицировали четыре возможных сайта для gRNA из их вычислительного анализа с подходящими свойствами для создания делеции с использованием никазы (Friedland, A. E. et al. (2015) *Genome biology* 16, 257; Mali, P. et al. (2013) *Nat Biotechnol*, doi:10.1038/nbt.2675; Ran, F. A. et al. (2013) *Cell*, doi:10.1016/j.cell.2013.08.021) (фиг. 4).

#### **2. Оценка in vitro в линиях клеток человека.**

Авторы настоящего изобретения сконструировали плазмиды для нацеливания SaCas9, которые содержат фланкирующие сайты NotI, чтобы обеспечить возможность простого субклонирования в вектор, содержащий ITR, необходимый для продукции AAV. Как и плазмиды для нацеливания SpCas9, они содержат уникальные сайты рестрикции

для быстрого клонирования специфических последовательностей gRNA. Для обеспечения эффективного нацеливания в каждом сайте сначала каждый сайт будет проанализирован на расщепление дцДНК в клетках HEK293. Используя ПЦР-праймеры, фланкирующие сайт-мишень, будет использоваться высокоточная полимераза (NEB, Phusion) для амплификации геномной последовательности, которая затем будет исследована на активность расщепления с помощью анализа с использованием T7EI, авторы настоящего изобретения обычно определяют эффективность нацеливания в пределах 30-75%. После того как эти сайты будут проверены на их способность индуцировать расщепление, они будут клонированы в созданную авторами настоящего изобретения плазмиду для нацеливания никазы SaCas9, которая содержит четыре H1-промоторные кассеты для экспрессии четырех gRNA. Впоследствии будет проведен анализ делеций с помощью ПЦР в клетках HEK293 для оценки эффективности конструкций для нацеливания авторов настоящего изобретения. Локусы вне мишени, предсказанные биоинформатикой авторов настоящего изобретения, будут оцениваться на предмет ложного мутагенеза.

**3. Высокопроизводительное секвенирование для мутагенеза на мишени/вне мишени.** Как описано выше, авторы настоящего изобретения также анализ с использованием сайт-специфического глубокого секвенирования для их экспериментов по нацеливанию SaCas9. Принимая во внимание, что авторы настоящего изобретения используют подход с использованием никазы, ими не ожидается обнаружение мутагенеза вне мишени, однако ими были определены альтернативные сайты нацеливания SaCas9, которые являются потенциальными альтернативами для создания интронной делеции криптоического экзона.

**4. Продукция AAV вирусов.** Это будет выполнено, как описано выше.

#### **Создание линий стволовых клеток LCAIO**

**Предпосылки и обоснование.** Хотя мыши могут служить отличными моделями для дегенераций сетчатки, мышь с *rd16*, который вызван мутацией в *SERP290*, не является подходящей моделью для исследования терапевтических средств CRISPR/AAV. В отличие

от точечной мутации у человека, фенотип дегенерации у мыши вызван большой (897 п.о.) гомозиготной делецией в рамке считывания. Таким образом, для лучшего воспроизведения болезни человека, в настоящее время авторы настоящего изобретения используют два подхода для создания клеток LCA10: 1) создание мутации IVS26 с.2991+1655 A→G в линиях от эмбриональных стволовых клеток человека H7, и 2) изогенные клеточные линии iPS, происходящие от фибробластов пациентов с LCA10.

#### **Экспериментальный дизайн и методы.**

**Линии hESC с отредактированным геном.** Авторы настоящего изобретения добились успеха, используя CRISPR-Cas9 для создания точечных мутаций с использованием олигонуклеотидов-доноров из ~150 оснований (~75 оснований фланкирующей гомологии). Плазмиды, кодирующие Cas9, последовательность gRNA, описанную выше, и донорный олигонуклеотид будут вводиться путем электропорации (Ranganathan, V. et al. (2014) *Nature communications* 5, 4516). Эффективность трансфекции будет контролироваться по флуоресценцию через 24 часа после электропорации, а нацеливание на гены в массе будет оцениваться с помощью анализа с использованием T7EI. Наконец, рекомбинантные клоны будут подвергнуты скринингу на желаемую вставку с помощью ПЦР, а затем проверены с помощью секвенирования по Сэнгеру. Множество гомозиготных и гетерозиготных линий, несущих мутацию A→G, будут выделены и оценены на предмет мутагенеза вне мишени, используя описанную выше биоинформатику.

**2. Происходящие от пациента линии iPSC.** В сотрудничестве с Johns Hopkins Wilmer Retinal Degeneration Clinic авторы настоящего изобретения в настоящее время занимаются поиском фибробластов пациентов с мутацией в CEP290. После идентификации, биопсии кожи будут собраны после информированного согласия в соответствии с существующим протоколом, одобренным Институциональным контрольным советом JHMI-SOM. Полученные от пациентов с LCA10 iPSC будут производиться с использованием установленных протоколов (Galluzzi, L. et al. (2012) *Cell death and differentiation* 19, 107-120; Yu, J. et al. (2007) *Science*

318, 1917–1920; Takahashi, K. *et al.* (2006) *Cell* 126, 663–676; Ludwig, T. E. *et al.* (2006) *Nat Biotechnol* 24, 185–187). Используя описанные выше способы, параллельно будут созданы изогенные клеточные линии со скорректированной мутацией, и предсказанные локусы вне мишени будут секвенированы по Сэнгеру для подтверждения отсутствия посторонних мутаций.

**Биоэтика.** Авторы настоящего изобретения будут использовать линию эмбриональных стволовых клеток человека H7 (WiCell); использование этих клеточных линий для предполагаемых экспериментов одобрено комитетом JHU ISCR0 (заявка ISCR000000023). Кроме того, авторы настоящего изобретения будут использовать hiPSC, созданную в их лаборатории при информированном согласии под эгидой Институционального контрольного совета JHU (IRB # NA\_00047271). Несмотря на то, что авторы настоящего изобретения не рассматривают линию клеток ES, они все же следуем всем правилам и положениям, предписанным Комитетом по надзору за исследованиями эмбриональных стволовых клеток JHU.

**3. Редактирование *in vitro* линий hESC с отредактированным геном и/или редактирование линий iPSC, происходящих от пациента.** Для тщательной оценки различных ведущих вирусных векторов, разработанных выше, будут исследоваться клетки либо из линий iPSC, происходящих от пациентов, либо из линий hESC с отредактированным геном; будут использоваться конструкции, которые нацелены на вызывающую LCA10 мутацию непосредственно с помощью WT SpCas9, eSpCas9 или SpCas9-HF, и конструкция, в случае которой использует подход с использованием никазы SaCas9 с четырьмя gRNA (фиг. 56). Во-первых, эффективность расщепления вне мишени будет определяться с помощью анализа с использованием T7EI. Для анализа с высоким разрешением MiSeq будет использоваться для количественной оценки мутагенеза на мишени и вне мишени. Поскольку нацеливание SpCas9 будет основано на подверженном ошибкам негомологичном присоединении конца (NHEJ) для устранения важных нуклеотидов для сплайсинга, этот анализ обеспечит хороший показатель терапевтического потенциала. В дополнение к эффективности расщепления и мутагенезу вне мишени,

qRT-PCR (количественная ОТ-ПЦР) будет использоваться для количественной оценки уровней экспрессии SER290 как с мутантной аллели, так и с аллели дикого типа. Это обеспечит первый шаг в валидации конструкций авторов настоящего изобретения. Принимая во внимание существующие у авторов настоящего изобретения возможности в лаборатории, могут быть выполнены количественные анализы цилиогенеза (Kim, J. et al. (2010) *Nature* 464, 1048-1051) с использованием их компьютера с высоким содержанием для оценки потенциала их терапевтических конструкций. Кроме того, авторы настоящего изобретения разработали протоколы для дифференциации стволовых клеток в фоторецепторы, что позволяет оценить фенотипическое восстановление в соответствующем типе клеток. Учитывая отсутствие хороших моделей на животных для оценки редактирования генома в случае LCA10, авторы настоящего изобретения полагают, что эти анализы будут ближе приближаться к истинному терапевтическому потенциалу их вирусных конструкций.

#### **Пример 6**

AAV5 доставляли с помощью субретинальной инъекции мышам P0,5. Через 14 дней из 28 дней сетчатки собирали и проводили анализ с использованием Endo I T7. (Примечание: мишенями AAV5 являются фоторецепторы палочек, и анализ проводился на общей сетчатке).

Для анализа с использованием Endo I T7, геномную ДНК экстрагировали путем ресуспендирования клеток в растворе QuickExtract (Epicenter, Madison, WI), инкубируя при 65°C в течение 20 минут, а затем при 98°C в течение 20 минут. Раствор экстракта использовали непосредственно или очищали с использованием DNA Clean and Concentrator (Zymo Research, Irvine, CA) и количественно оценивали с помощью NanoDrop (Thermo 30 Fisher Scientific). Геномную область, окружающую сайт-мишень для CRISPR, амплифицировали из ~100 нг геномной ДНК, используя ДНК-полимеразу Phusion (New England Biolabs). Множество независимых реакций ПЦР объединяли и очищали с использованием DNA Clean and Concentrator (Zymo Research, Irvine, CA). Объем 25 мкл, содержащий 150 нг продукта ПЦР в 10 mM Трис-HCl, 50 mM

NaCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub> и 100 мкг/мл BSA, денатурировали и медленно подвергали повторному отжигу для допуска образования гетеродуплексов: 95°C в течение 10 мин, от 95°C до 85°C со скоростью изменения температуры -1,0°C/с, 85°C в течение 1 с, от 85 до 75°C со скоростью -1,0°C/с, 75°C в течение 1 с, от 75 до 65°C со скоростью -1,0°C/с, 65°C в течение 1 с, от 65°C до 55°C со скоростью -1,0°C/с, 55°C в течение 1 с, от 55 до 45°C со скоростью -1,0°C/с, 45°C в течение 1 с, от 45°C до 35°C со скоростью -1,0°C/с, 35°C в течение 1 с, от 35°C до 25°C со скоростью -1,0°C/с, и затем выдерживали при 4°C. К каждой реакции добавляли 1 мкл EndoI T7 (New England Biolabs), инкубировали при 37°C в течение 30 минут и затем сразу же помещали на лед. Для анализа в геле 3 мкл реакционной смеси смешивали с 3 мкл 2х загрузочного красителя (New England Biolabs), вносили в 6% ТВЕ-ПААГ для электрофореза и окрашивали SYBR Gold (1:10000) в течение ~15 минут до визуализации. Гели визуализировали в системе формирования изображений Gel Logic 200 (Kodak, 15 Rochester, NY) и количественно оценивали с использованием ImageJ v. 1.46. Частоты NHEJ рассчитывали с использованием биномиального уравнения:

$$\% \text{ модификации гена} = 100 * (1 - (\text{SQRT}(1 - ((a+b)/(a+b+c))))))$$

где значения «а» и «b» равны суммарной площади расщепленных фрагментов после вычитания фона, а «с» равен суммарной площади нерасщепленного продукта ПЦР после вычитания фона.

1. Levkovitch-Verbin H *et al.* *iovsorg* 44, 3388-3393 (2003).
2. Howell GR *et al.* *J Cell Biol* 179, 1523-1537 (2007).
3. Adalbert R *et al.* *Science* (2012), doi:10.1126/science.1223899.
4. Yang J *et al.* *Cell* 160, 161-176 (2015).
5. Welsbie DS *et al.* *Proc Nat Acad Sci USA* 110, 4045-4050 (2013).
6. Watkins TA *et al.* *Proc Nat Acad Sci USA* 110, 4039-4044 (2013).
7. Barres BA *et al.* *Neuron* 1, 791-803 (1988).

8. Miller BR *et al.* *Nat Neurosci* 12, 387-389 (2009).
9. Petrs-Silva H *et al.* *Mol Ther* 19, 293-301 (2011).
10. Petrs-Silva H *et al.* *Mol Ther* 17, 463-471 (2009).
11. Sun H *et al.* *Mol Vis* 17, 864-875 (2011).
12. Ribas VT *et al.* *Neuroscience* 180, 64-74 (2011).
13. Davis MI *et al.* *Nat Biotechnol* 29, 1046-1051 (2011).
14. Karaman MW *et al.* *Nat Biotechnol* 26, 127-132 (2008).
15. Bounoutas A *et al.* *Proc Nat Acad Sci USA* 108, 3982-3987 (2011).
16. Takihara Y *et al.* *Invest Ophthalmol Vis Sci* 52, 3039-3045 (2011).
17. Jackson AL *et al.* *RNA* 12, 1179-1187 (2006).
18. Jackson AL *et al.* *Nat Biotechnol* 21, 635-637 (2003).
19. Marine S *Journal of Biomolecular Screening* 17, 370 (2011).
20. Hannus M *et al.* *Nucleic Acids Res* 42, 8049-8061 (2014).
21. Chen S *et al.* *Cell* 159, 440 (2014).
22. Buehler E *et al.* *Sci Rep* 2, 428 (2012).
23. Yoshida K *et al.* *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43, 1631-1635 (2002).
24. Bhoumik A *et al.* *Proc Nat Acad Sci USA* 101, 4222-4227 (2004).
25. Jiang Y *et al.* *J Biol Chem* 288, 18429-18438 (2013).
26. Lin L *et al.* *Dev Dyn* 240, 52-64 (2010).
27. Okamoto S *et al.* *Proc Nat Acad Sci USA* 97, 7561-7566 (2000).
28. Ornatsky OI *et al.* *Journal of Biological Chemistry* 272, 33271-33278 (1997).
29. Shalizi A *et al.* *Science* 311, 1012-1017 (2006).
30. Akhtar MW *et al.* *PLoS ONE* 7, e34863 (2012).
31. Xiong X *et al.* *J Cell Biol* 191, 211-223 (2010).
32. Fernandes KA *et al.* *Neurobiol Dis* 69, 108-116 (2014).
33. de Lima S *et al.* *Proc Nat Acad Sci USA* 109, 9149-9154 (2012).
34. Smith PD *et al.* *Neuron* 64, 617-623 (2009).
35. Sun F *et al.* *Nature* 480, 372-375 (2011).

36. Babetto E *et al.* *Cell Rep* 3, 1422-1429 (2013).
37. Huntwork-Rodriguez S *et al.* *J Cell Biol* 202, 747-763 (2013).
38. Culican SM *et al.* *Mol Cell Neurosci* 41, 304-312 (2009).
39. Vo BQ *et al.* *Vis Neurosci* 28, 175-181 (2011).
40. Yan D *et al.* *Neuron* 76, 534-548 (2012).
41. Kampmann M *et al.* *Proc Nat Acad Sci USA* 112, E3384-91 (2015).
42. González F *et al.* *Cell Stem Cell* 15, 215-226 (2014).
43. Wong N *et al.* *Genome Biol* 16, 218 (2015).
44. Doench JG *et al.* *Nat Biotechnol* 32, 1262-1267 (2014).
45. Yang L *et al.* *Nat Commun* 5, 5507 (2014).
46. Varshney GK *et al.* *Genome Res* 25, 1030-1042 (2015).
47. Wang TH *et al.* *J Biol Chem* 273, 4928-4936 (1998).
48. Hu J *et al.* *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* 1844, 224-231 (2014).
49. Fiedler D *et al.* *Cell* 136, 952-963 (2009).
50. Wu CC *et al.* *Cell Cycle* 14, 1207 (2015).
51. Swiech L *et al.* *Nat Biotechnol* 33, 102-106 (2015).
52. Ran FA *et al.* *Nature* 520, 186-191 (2015).
53. Ranganathan V *et al.* *Nat Commun* 5, 4516 (2014).
54. Baer M *et al.* *Nucleic Acids Res* 18, 97-103 (1990).
55. Myslinski E *Nucleic Acids Res* 29, 2502 (2001).
56. Koilkonda R *et al.* *Mol Vis* 15, 2796 (2009).
57. Bemelmans AP *et al.* *PLoS ONE* 8, e61618 (2013).
58. Byrne LC *et al.* *Mol Ther* 23, 290 (2014).
59. Hirai SI *et al.* *J Neurosci* 31, 6468-6480 (2011).
60. Bei F *et al.* *Cell* 164, 219-232 (2016).
61. Ramakrishna S *et al.* *Nat Commun* 5, 3378 (2014).
62. Tsai SQ *et al.* *Nat Biotechnol* 33, 187-197 (2015).
63. Parsons BD *et al.* *PLoS ONE* 4, e8471 (2009).
64. Slaymaker IM *et al.* 351, 84-88 (2015).
65. Kleinstiver BP *et al.* *Nature* (2016).
66. Fu Y *et al.* *Nat Biotechnol* 32, 279-284 (2014).
67. Ran FA *et al.* *Cell* 154, 1380-1389 (2013).
68. Potthoff MJ *Development* 134, 4131-4140 (2007).

69. Okamoto SI *et al.* *Proc Nat Acad Sci USA* 99, 3974-3979 (2002).
70. Gong X *et al.* *Neuron* 38, 33-46 (2003).
71. Flavell SW *et al.* *Science* 311, 1008-1012 (2006).
72. Thomas SN *et al.* *Anal Chem* 87, 10830-10838 (2015).
73. Aiyetan P *et al.* *BMC Bioinformatics* 16, 411 (2015).

#### ССЫЛКИ

Все публикации, заявки на патенты, патенты и другие ссылки, упомянутые в описании, указывают на уровень специалистов в данной области техники, к которой относится раскрываемый сейчас предмет изобретения. Все публикации, заявки на патенты, патенты и другие ссылки включены сюда посредством ссылки в той же степени, как если бы было специально и индивидуально указано, что каждая отдельная публикация, заявка на патент, патент и другая ссылка включена посредством ссылки. Понятно, что, хотя здесь ссылаются на ряд заявок на патенты, патенты и другие ссылочные документы, такая ссылка не является допущением того, что любой из этих документов является частью общих знаний в данной области техники.

Хотя вышеизложенный предмет изобретения был описан в некоторых деталях с целью иллюстрации и примера для ясности понимания, специалистам в данной области техники будет понятно, что определенные изменения и модификации могут быть осуществлены в пределах объема прилагаемой формулы изобретения.

**ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ**

1. Способ лечения дегенерации сетчатки у нуждающегося в этом субъекта, при этом способ включает:

(a) обеспечение не встречающейся в природе нуклеазной системы, включающей один или более векторов, содержащих:

i) промотор, функционально связанный с по меньшей мере одной нуклеотидной последовательностью, кодирующей РНК-проводник (gRNA) нуклеазной системы, причем gRNA гибридизуется с последовательностью-мишенью молекулы ДНК в клетке субъекта, и причем молекула ДНК кодирует один или более продуктов генов, экспрессируемых в клетке; и

ii) действующий в клетке регуляторный элемент, функционально связанный с нуклеотидной последовательностью, кодирующей нацеленную на геном нуклеазу, причем компоненты (i) и (ii) расположены в одном и том же или в разных векторах системы, причем gRNA нацеливается и гибридизуется с последовательностью-мишенью, а нуклеаза расщепляет молекулу ДНК с изменением экспрессии одного или более продуктов генов; и

(b) введение в область сетчатки субъекта терапевтически эффективного количества системы.

2. Способ по п. 1, в котором система представляет собой CRISPR.

3. Способ по п. 1, в котором система упакована в одну частицу аденоассоциированного вируса (AAV).

4. Способ по п. 1, в котором система инактивирует один или более продуктов генов.

5. Способ по п. 1, в котором нуклеазная система вырезает по меньшей мере одну мутацию в гене.

6. Способ по п. 1, в котором промотором является двунаправленный промотор.

7. Способ по п. 6, в котором двунаправленным промотором является H1.

8. Способ по п. 7, в котором промотор H1 включает:

a) контрольные элементы, которые обеспечивают транскрипцию в одном направлении по меньшей мере одной нуклеотидной последовательности, кодирующей gRNA; и

b) контрольные элементы, которые обеспечивают транскрипцию в противоположном направлении нуклеотидной последовательности, кодирующей нацеленную на геном нуклеазу.

9. Способ по п. 1, в котором нацеленной на геном нуклеазой является белок Cas9.

10. Способ по п. 9, в котором белок Cas9 является оптимизированным в отношении частоты использования кодонов для экспрессии в клетке.

11. Способ по любому из п.п. 6-7, в котором промотор функционально связан с по меньшей мере одной, двумя, тремя, четырьмя, пятью, шестью, семью, восемью, девятью или десятью gRNA.

12. Способ по п. 1, в котором область сетчатки представляет собой сетчатку.

13. Способ по п. 1, в котором клетка представляет собой фоторецепторную клетку сетчатки.

14. Способ по п. 1, в котором клетка представляет собой ганглиозную клетку сетчатки.

15. Способ по п. 1, в котором дегенерацию сетчатки выбирают из группы, состоящей из врожденного амавроза Лебера (LCA), пигментного ретинита (RP) и глаукомы.

16. Способ по п. 15, в котором дегенерация сетчатки представляет собой LCA1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 или 18.

17. Способ по п. 16, в котором дегенерация сетчатки представляет собой LCA10.

18. Способ по любому из п.п. 16-17, в котором последовательность-мишень находится в вызывающем LCA10 гене CER290.

19. Способ по любому из п.п. 16-18, в котором последовательность-мишень представляет собой мутацию в гене CER290.

20. Способ по любому из п.п. 16-19, в котором последовательность-мишень выбирают из группы, состоящей из нуклеотидных последовательностей, представленных в SEQ ID NO:1-109, 164-356, 735-738, или их комбинаций.

21. Способ по п. 20, в котором последовательность-мишень включает функционально связанные SEQ ID NO:1, 2, 3 и 4.

22. Способ по п. 1, в котором вектор включает нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 110.

23. Способ по п. 15, в котором дегенерация сетчатки представляет собой аутосомно-доминантную форму пигментного ретинита (ADRP).

24. Способ по п. 1, в котором один или более продуктов генов представляют собой родопсин.

25. Способ по п. 1, в котором последовательность-мишень представляет собой мутацию в гене родопсина.

26. Способ по п. 1, в котором последовательность-мишень представляет собой мутацию в R135 гена родопсина.

27. Способ по п. 26, в котором мутацию в R135 выбирают из группы, состоящей из R135G, R135W, R135L.

28. Способ по любому из п.п. 25-27, в котором последовательность-мишень выбирают из группы, состоящей из нуклеотидных последовательностей, представленных в SEQ ID NO:111-126, или их комбинаций.

29. Способ по п. 1, в котором последовательность gRNA выбирают из группы, состоящей из нуклеотидных последовательностей, представленных в SEQ ID NO: 127-142, или их комбинаций.

30. Способ по п. 15, в котором дегенерация сетчатки представляет собой глаукому.

31. Способ по п. 1, в котором один или более продуктов генов представляют собой киназу с двойной лейциновой застежкой-молнией (DLK), киназу с лейциновой застежкой-молнией (LZK), ATF2, JUN, SRY-бок 11 (ответственную за определение пола область Y-хромосомы-бок 11) (SOX11), миоцит-специфический энхансерный фактор 2A (MEF2A), JNK1-3, MKK4, MKK7, SOX11 или PUMA, или их комбинации.

32. Способ по п. 1, в котором один или более продуктов генов являются членами пути с участием DLK/LZK, MKK4/7, JNK1/2/3 или SOX11/ATF2/JUN/MEF2A.

33. Способ по п. 1, в котором последовательность-мишень

выбирают из группы, состоящей из нуклеотидных последовательностей, представленных в SEQ ID NO:143-163, или их комбинаций.

34. Способ по п. 1, в котором введение субъекту происходит путем имплантации, инъекции или вирусного воздействия.

35. Способ по п. 34, в котором введение субъекту происходит путем субретинальной инъекции.

36. Способ по п. 1, в котором субъектом является человек.

37. Способ изменения экспрессии одного или более продуктов генов в клетке, причем клетка включает молекулу ДНК, кодирующую один или более продуктов генов, при этом способ включает введение в клетку не встречающейся в природе нуклеазной система, включающей один или более векторов, содержащих:

a) промотор, функционально связанный с по меньшей мере одной нуклеотидной последовательностью, кодирующей РНК-проводник (gRNA) нуклеазной системы, причем gRNA гибридизуется с последовательностью-мишенью молекулы ДНК; и

b) действующий в клетке регуляторный элемент, функционально связанный с нуклеотидной последовательностью, кодирующей нацеленную на геном нуклеазу, причем компоненты (a) и (b) расположены в одном и том же или в разных векторах системы, причем gRNA нацеливается и гибридизуется с последовательностью-мишенью, а нуклеаза расщепляет молекулу ДНК с изменением экспрессии одного или более продуктов генов.

38. Способ по п. 37, в котором система представляет собой CRISPR.

39. Способ по любому из п.п. 36-37, в котором система упакована в одну частицу аденоассоциированного вируса (AAV).

40. Способ по п. 37, в котором система инактивирует один или более продуктов генов.

41. Способ по п. 37, в котором нуклеазная система вырезает по меньшей мере одну мутацию в гене.

42. Способ по п. 37, в котором промотором является промотор H1.

43. Способ по п. 42, в котором промотор H1 является двунаправленным.

44. Способ по любому из п.п. 42-43, в котором промотор H1 включает:

а) контрольные элементы, которые обеспечивают транскрипцию в одном направлении по меньшей мере одной нуклеотидной последовательности, кодирующей gRNA; и

б) контрольные элементы, которые обеспечивают транскрипцию в противоположном направлении нуклеотидной последовательности, кодирующей нацеленную на геном нуклеазу.

45. Способ по п. 37, в котором нацеленной на геном нуклеазой является Cas9.

46. Способ по п. 45, в котором белок Cas9 является оптимизированным в отношении частоты использования кодонов для экспрессии в клетке.

47. Способ по любому из п.п. 42-44, в котором промотор функционально связан с по меньшей мере одной, двумя, тремя, четырьмя, пятью, шестью, семью, восемью, девятью или десятью gRNA.

48. Способ по п. 37, в котором клетка представляет собой эукариотическую или неэукариотическую клетку.

49. Способ по п. 48, в котором эукариотическая клетка представляет собой клетку млекопитающего или человека.

50. Способ по п. 49, в котором клетка представляет собой фоторецепторную клетку сетчатки.

51. Способ по п. 49, в котором клетка представляет собой ганглиозную клетку сетчатки.

52. Способ по п. 37, в котором один или более продуктов генов представляют собой вызывающий LCA10 ген CEP290.

53. Способ по п. 37, в котором последовательность-мишень выбирают из группы, состоящей из нуклеотидных последовательностей, представленных в SEQ ID NO:1-109, 164-356, 735-738 или их комбинации.

54. Способ по п. 53, в котором последовательность-мишень включает функционально связанные SEQ ID NO:1, 2, 3 и 4.

55. Способ по п. 37, в котором вектор включает нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO:110.

56. Способ по п. 37, в котором один или более продуктов

генов представляют собой родопсин.

57. Способ по п. 37, в котором последовательность-мишень представляет собой мутацию в гене родопсина.

58. Способ по п. 57, в котором последовательность-мишень представляет собой мутацию в R135 гена родопсина.

59. Способ по любому из п.п. 57-58, в котором мутацию в R135 выбирают из группы, состоящей из R135G, R135W, R135L.

60. Способ по любому из п.п. 57-59, в котором последовательность-мишень выбирают из группы, состоящей из нуклеотидных последовательностей, представленных в SEQ ID NO:111-126, или их комбинаций.

61. Способ по п. 37, в котором последовательность gRNA выбирают из группы, состоящей из нуклеотидных последовательностей, представленных в SEQ ID NO:127-142, или их комбинаций.

62. Способ по п. 37, в котором один или более продуктов генов представляют собой киназу с двойной лейциновой застежкой-молнией (DLK), киназу с лейциновой застежкой-молнией (LZK), ATF2, JUN, SRY-бокс 11 (ответственную за определение пола область Y-хромосомы-бокс 11) (SOX11), миоцит-специфический энхансерный фактор 2A (MEF2A), JNK1-3, MKK4, MKK7, SOX11 или PUMA, или их комбинации.

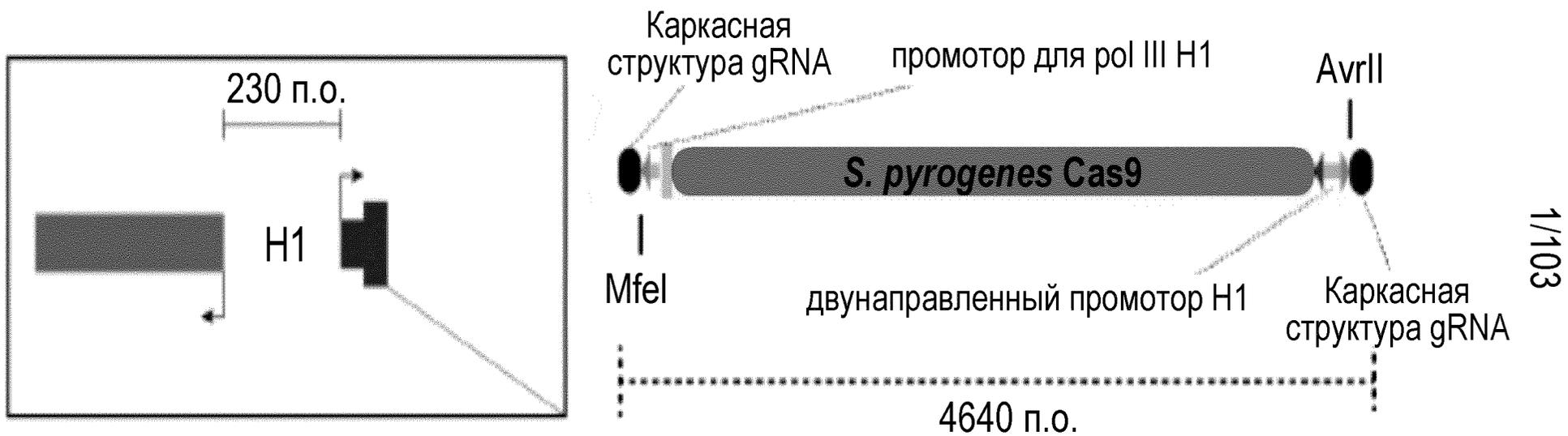
63. Способ по п. 1, в котором один или более продуктов генов являются членами пути с участием DLK/LZK, MKK4/7, JNK1/2/3 или SOX11/ATF2/JUN/MEF2A.

64. Способ по п. 37, в котором последовательность-мишень выбирают из группы, состоящей из нуклеотидных последовательностей, представленных в SEQ ID NO:143-163, или их комбинаций.

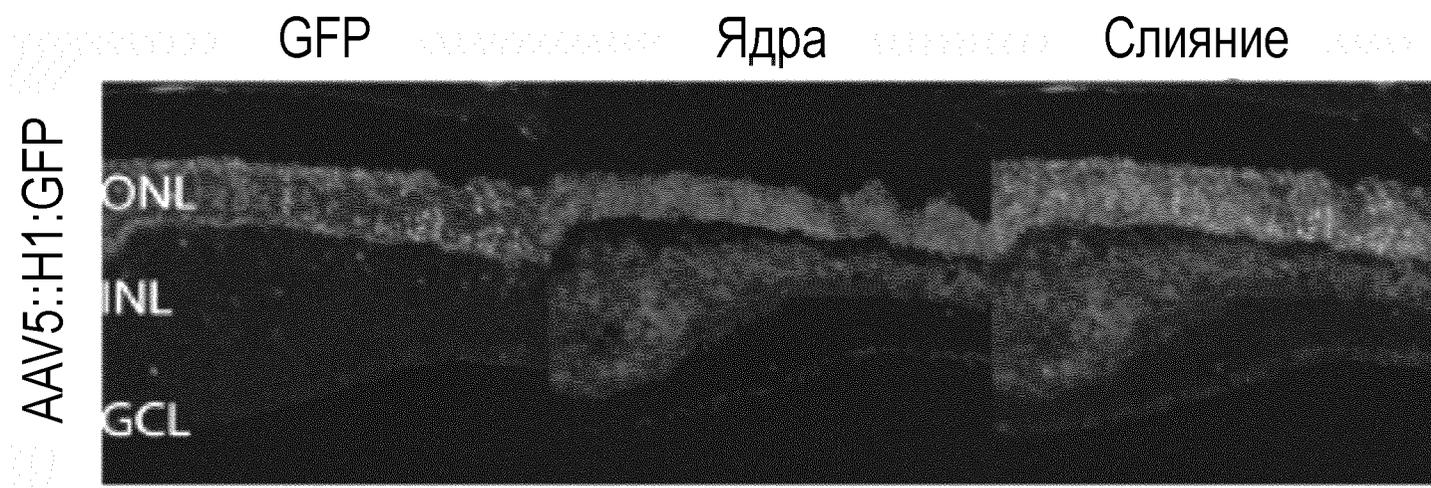
65. Способ по п. 37, в котором снижается экспрессия одного или более продуктов генов.

По доверенности

ФИГ.1



ФИГ.2



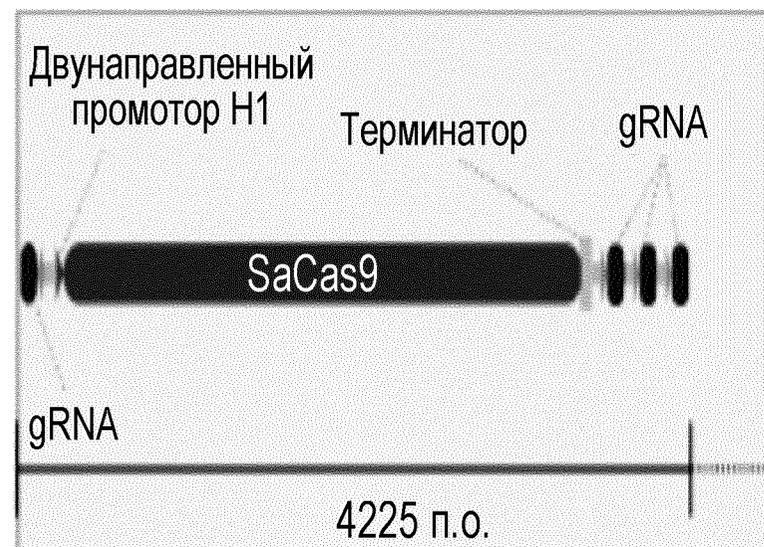
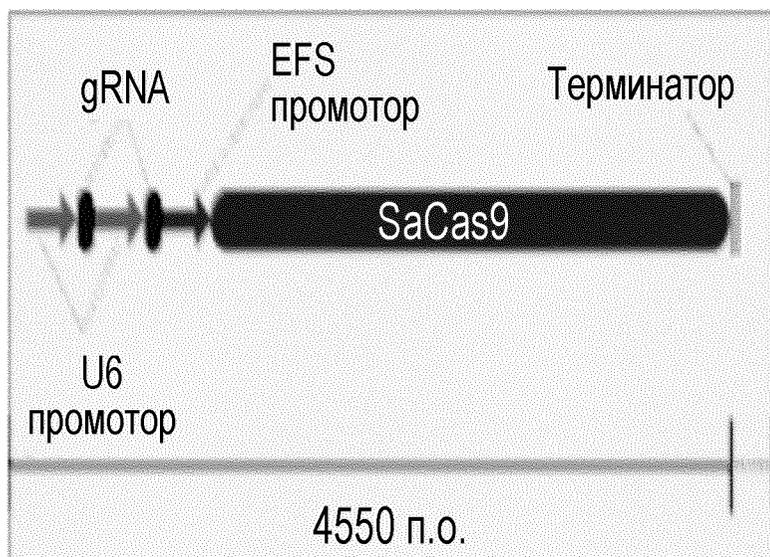
ФИГ.3

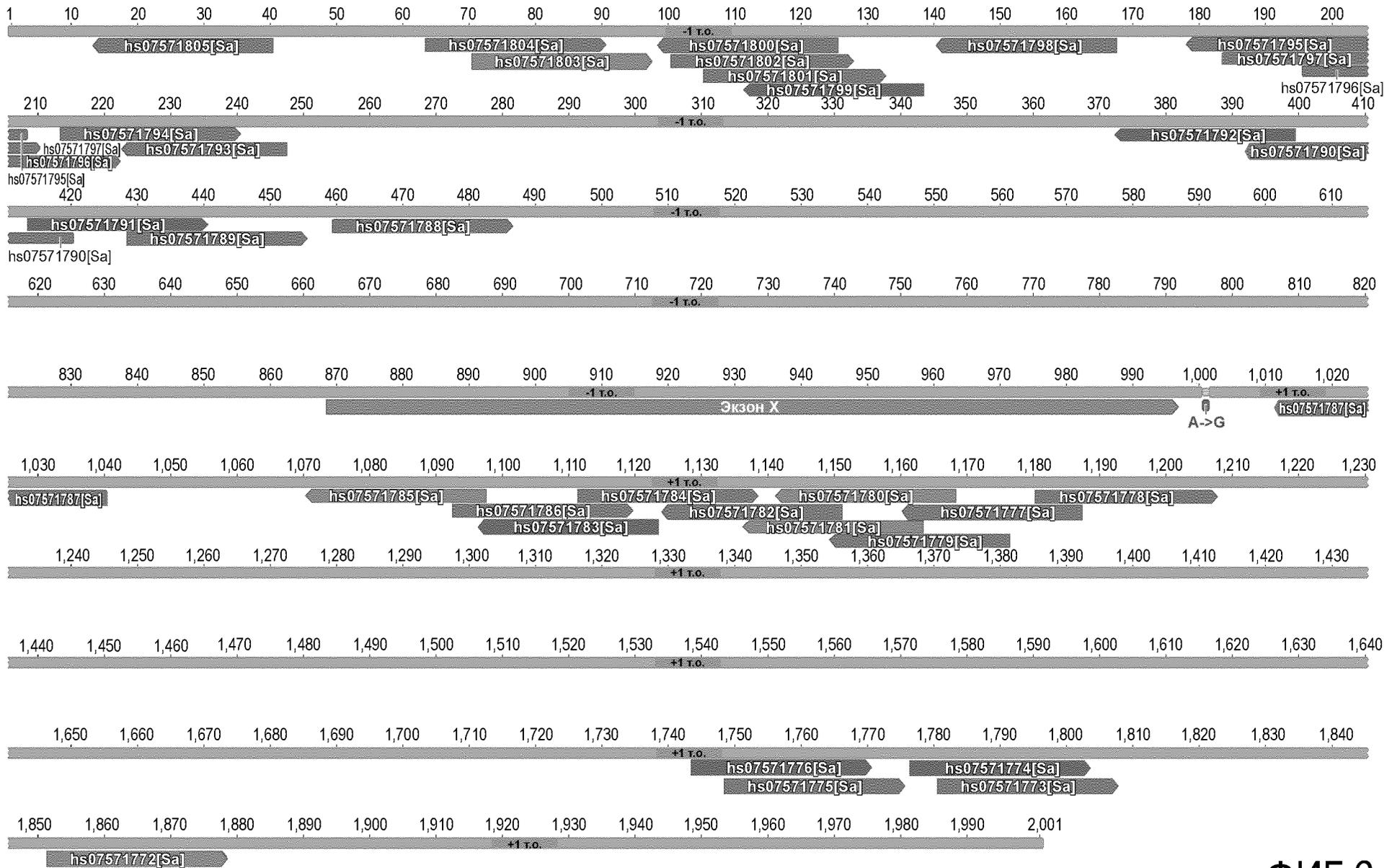


ФИГ.4



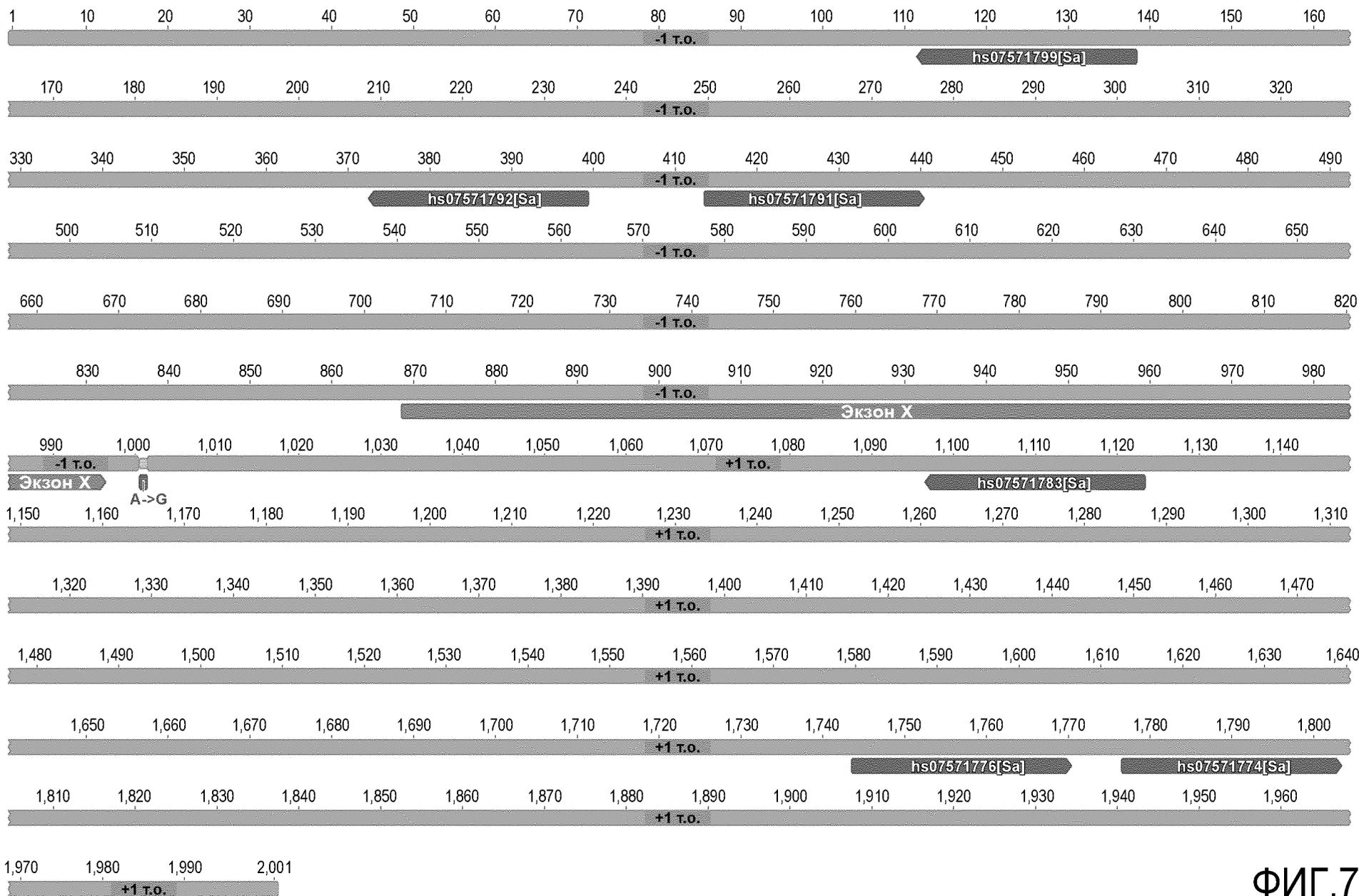
ФИГ.5





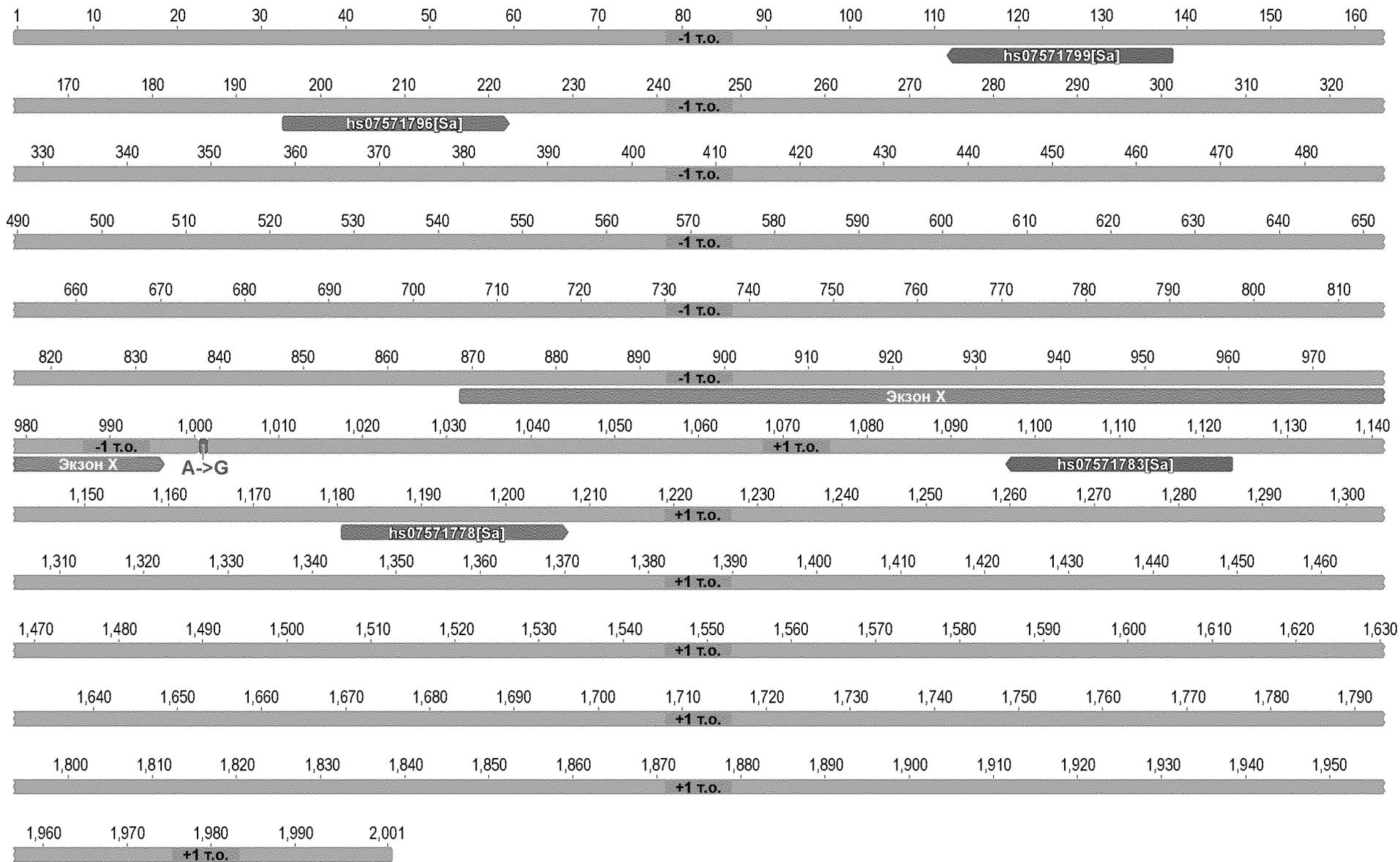
6/103

ФИГ.6



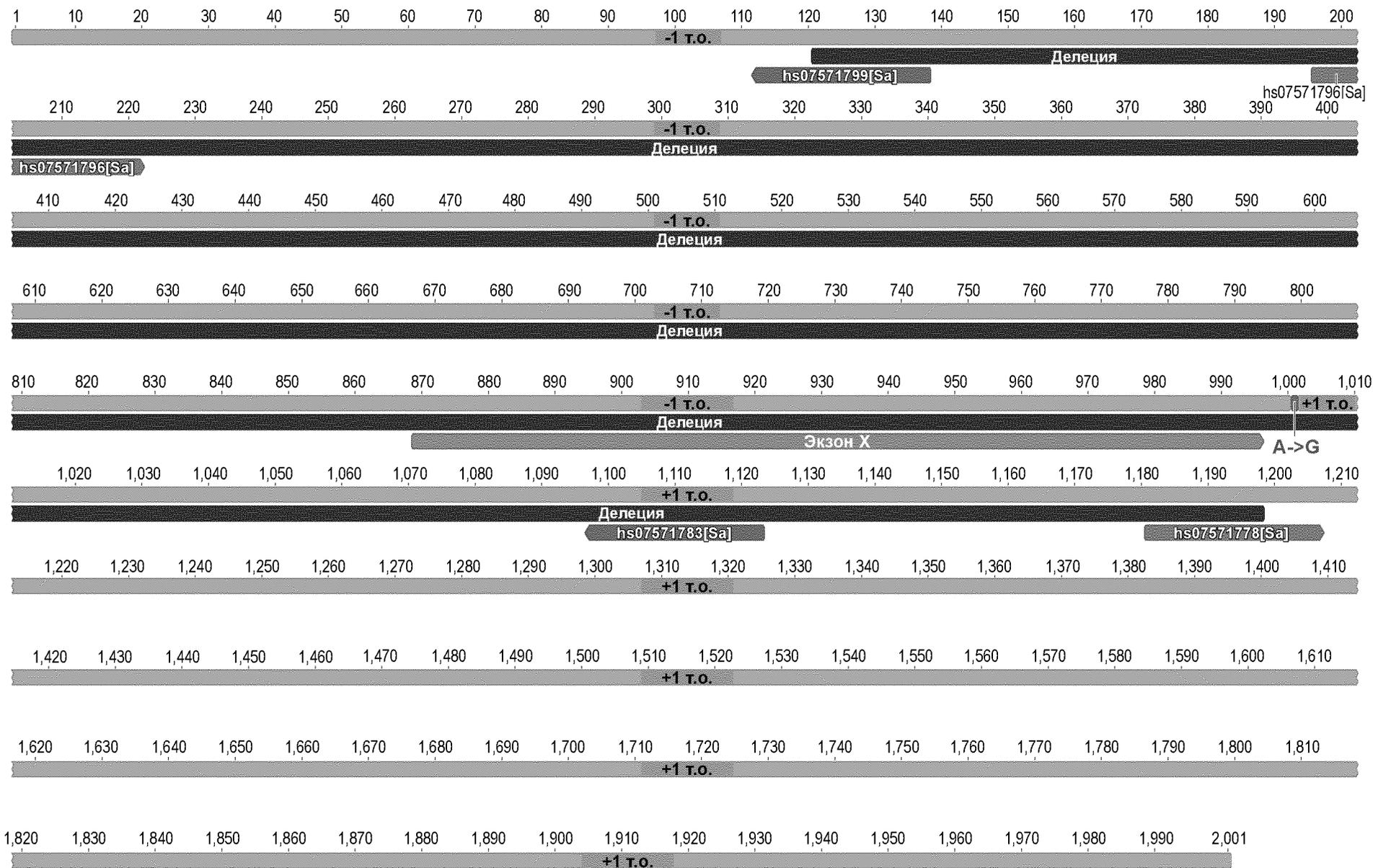
7/103

ФИГ.7



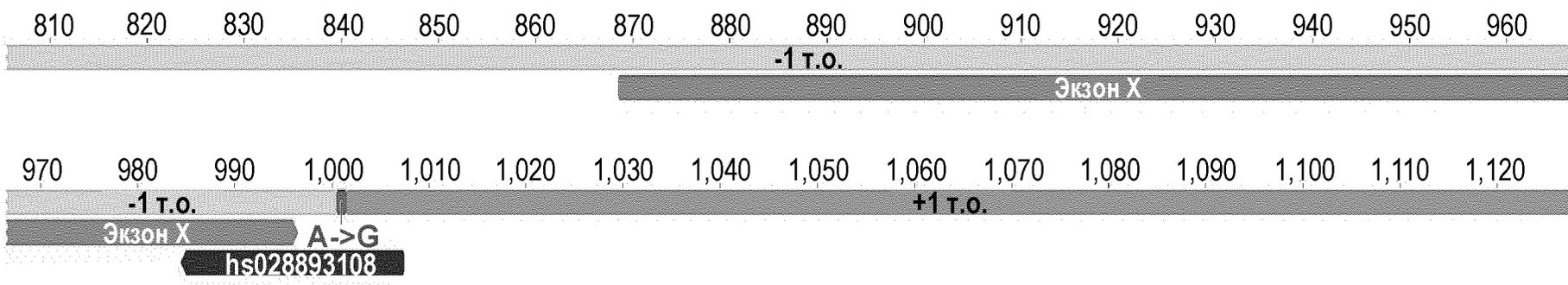
8/103

ФИГ.8



9/103

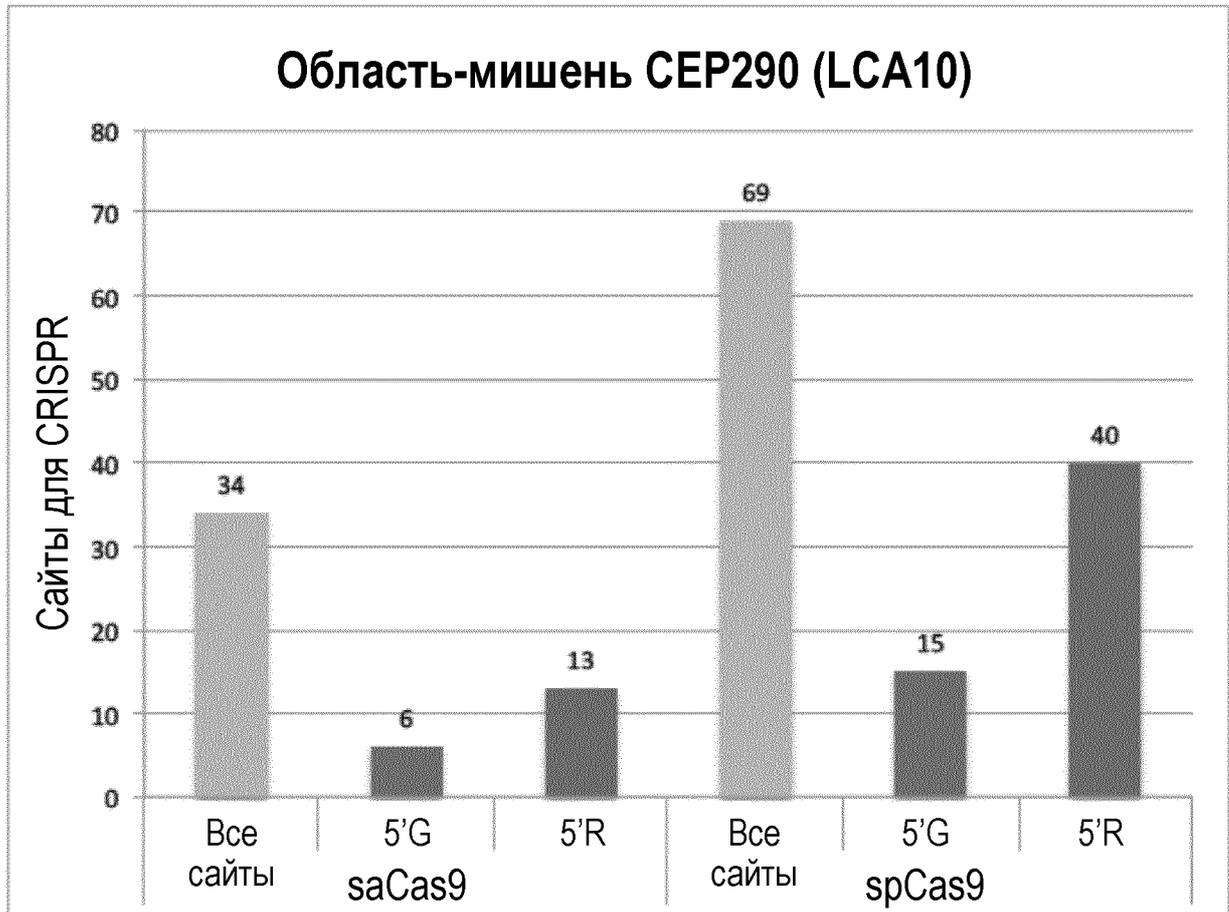
ФИГ.9



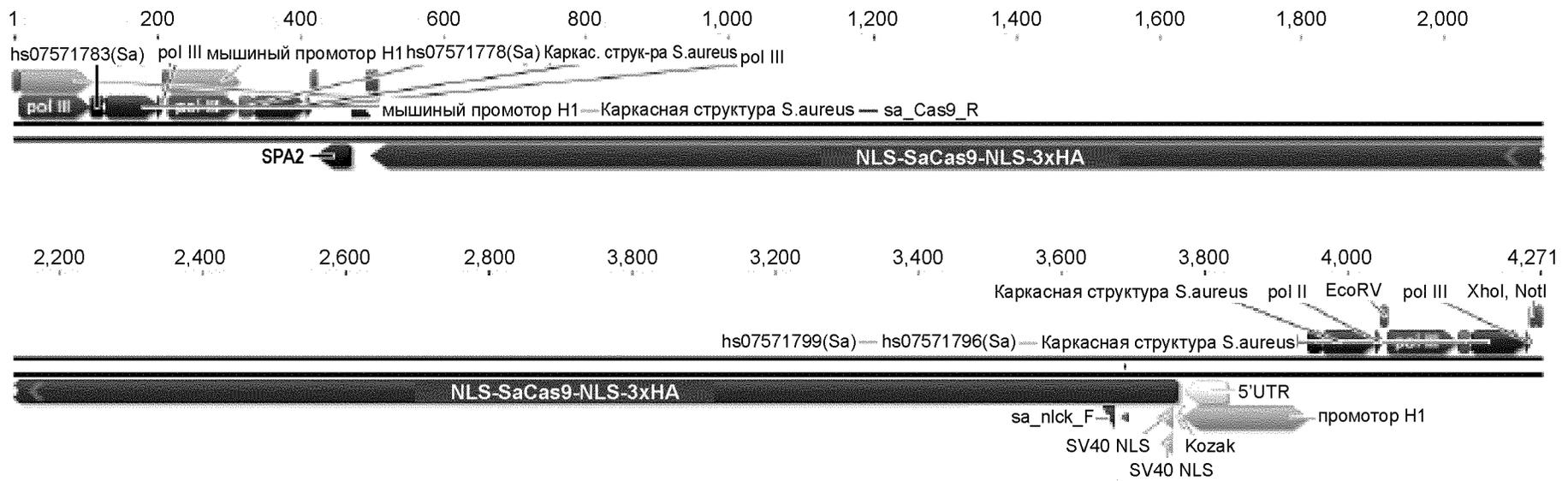
10/103

ФИГ.10

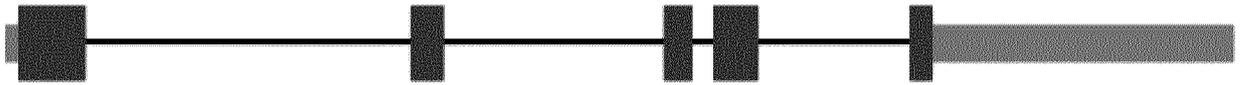
ФИГ.11



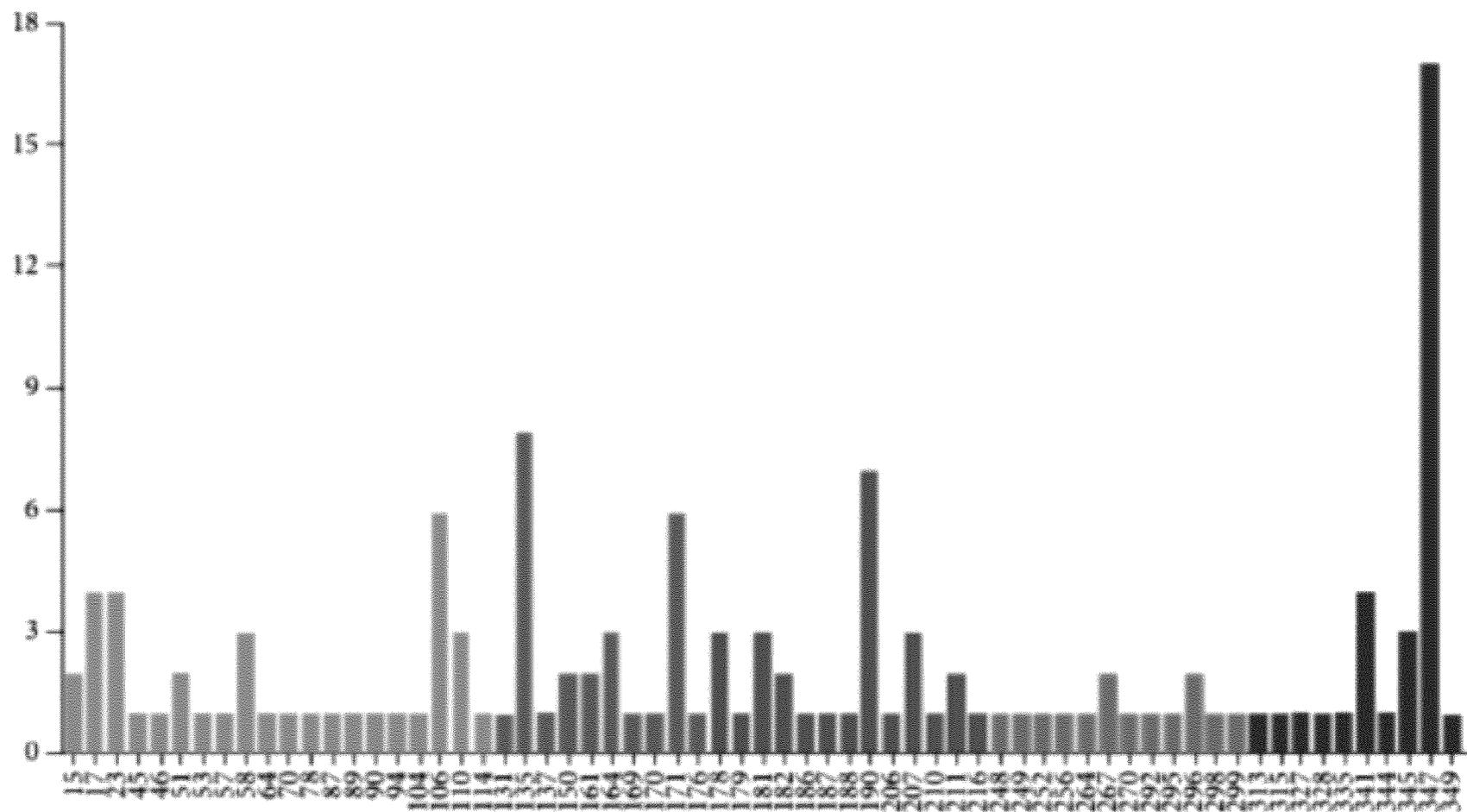
ФИГ.12



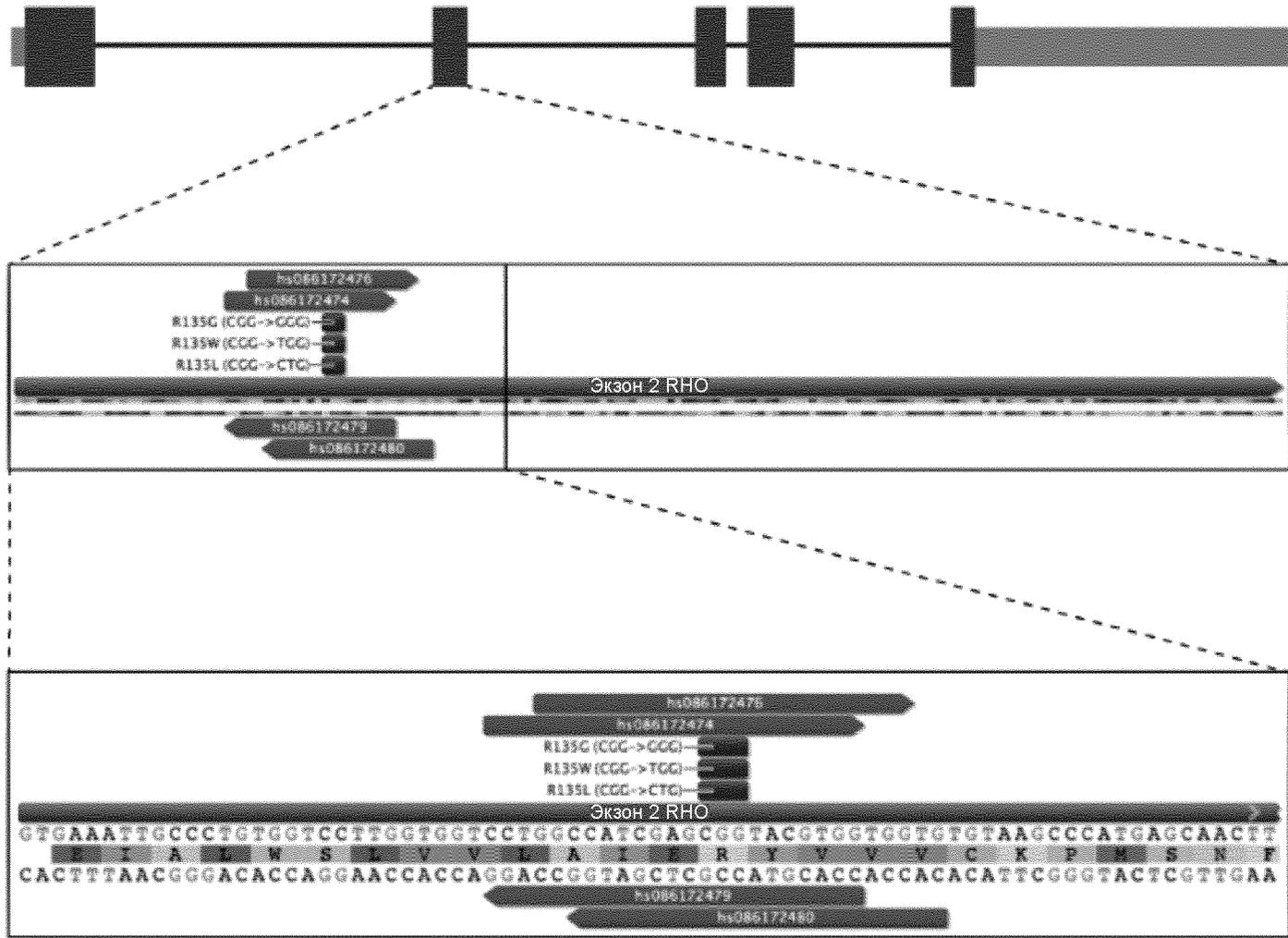
ФИГ.13



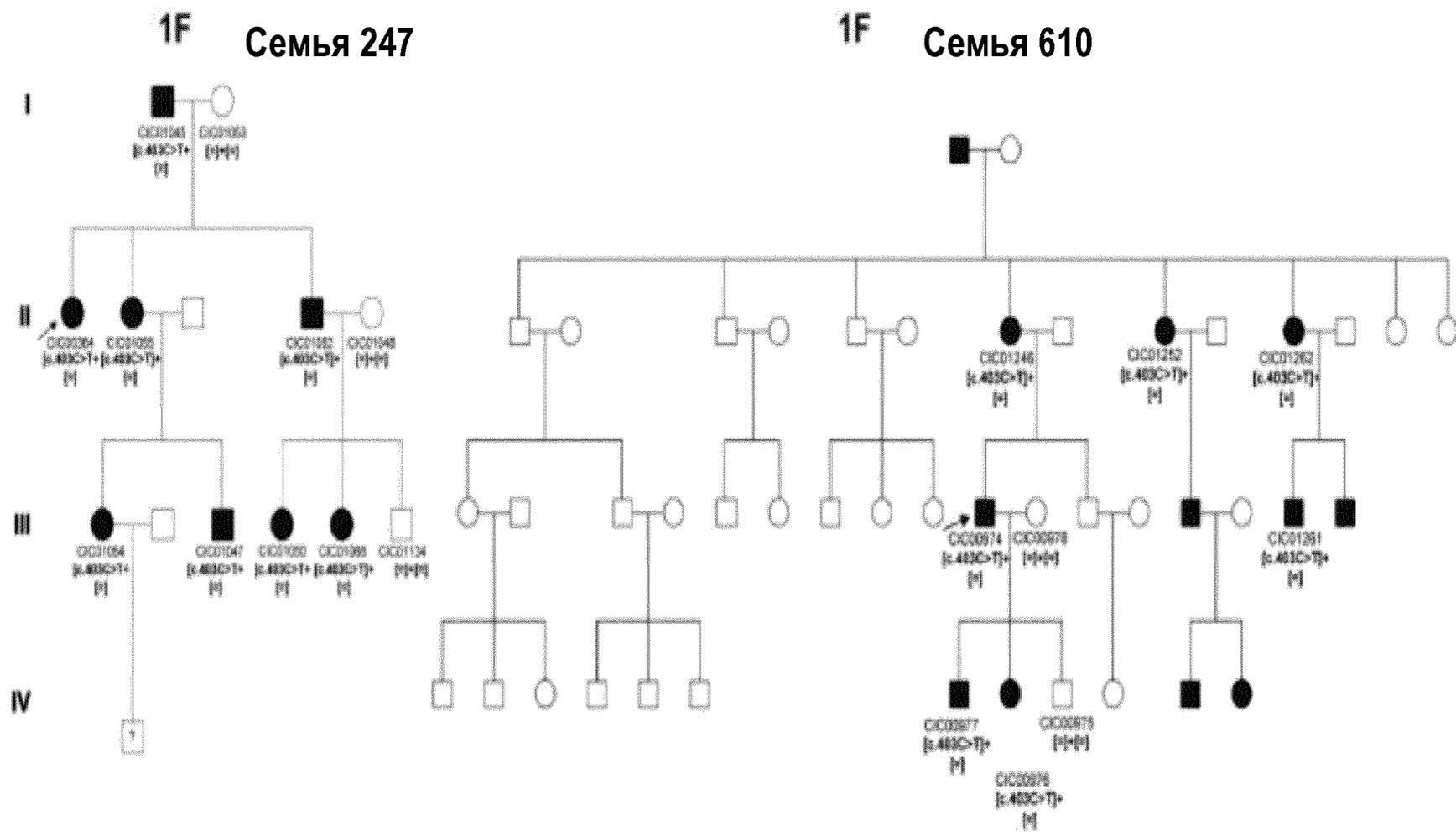
ФИГ.14



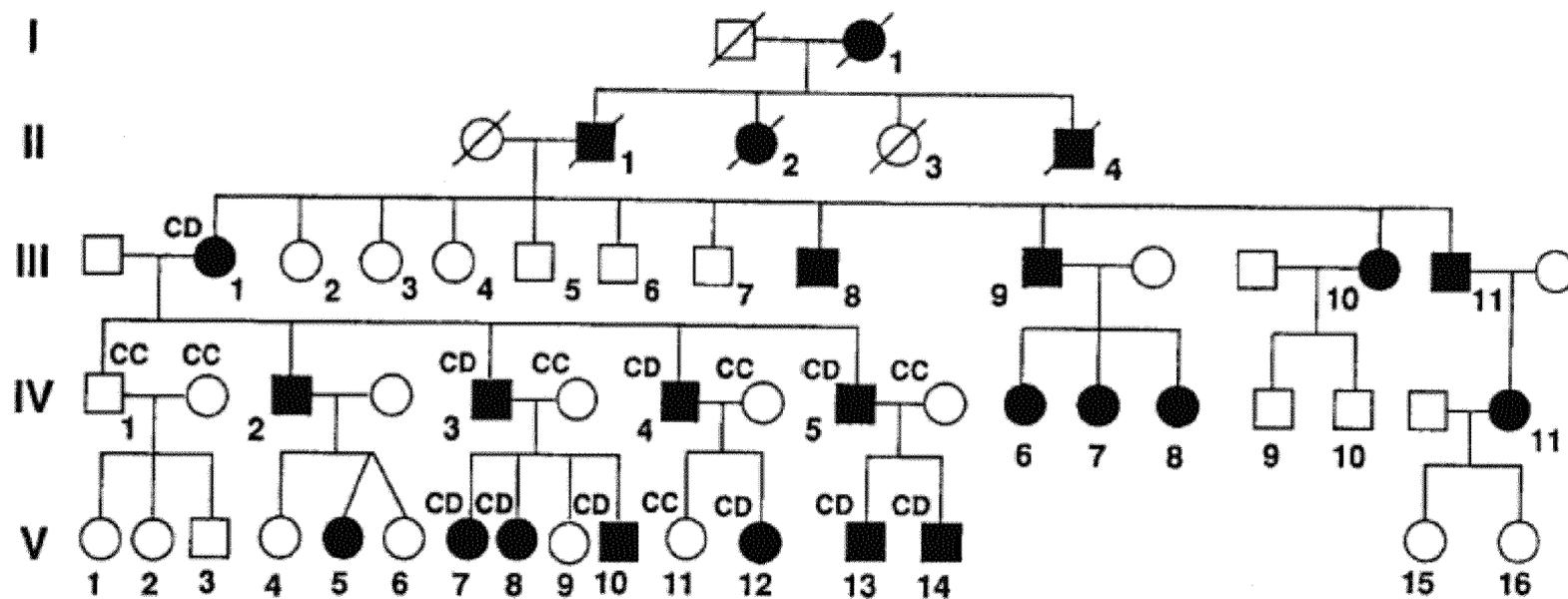
ФИГ.15



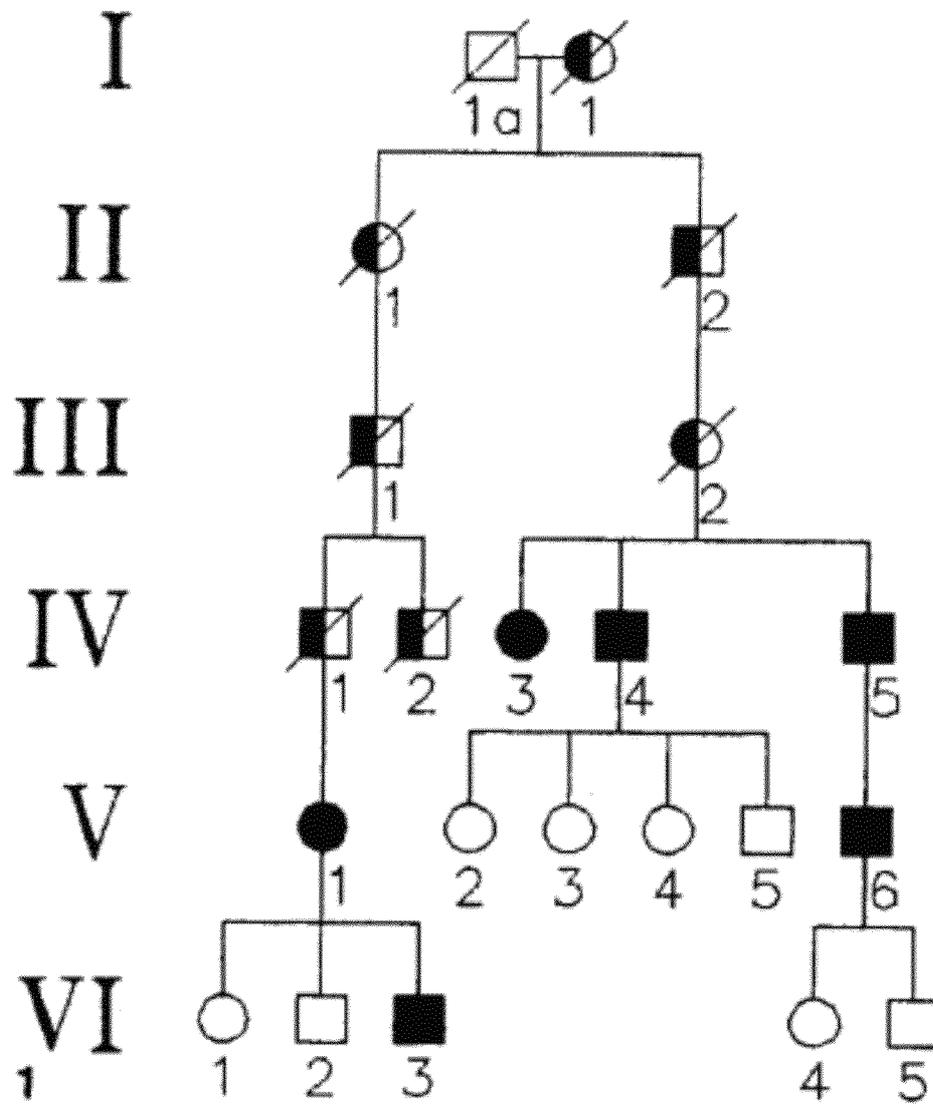
ФИГ.16



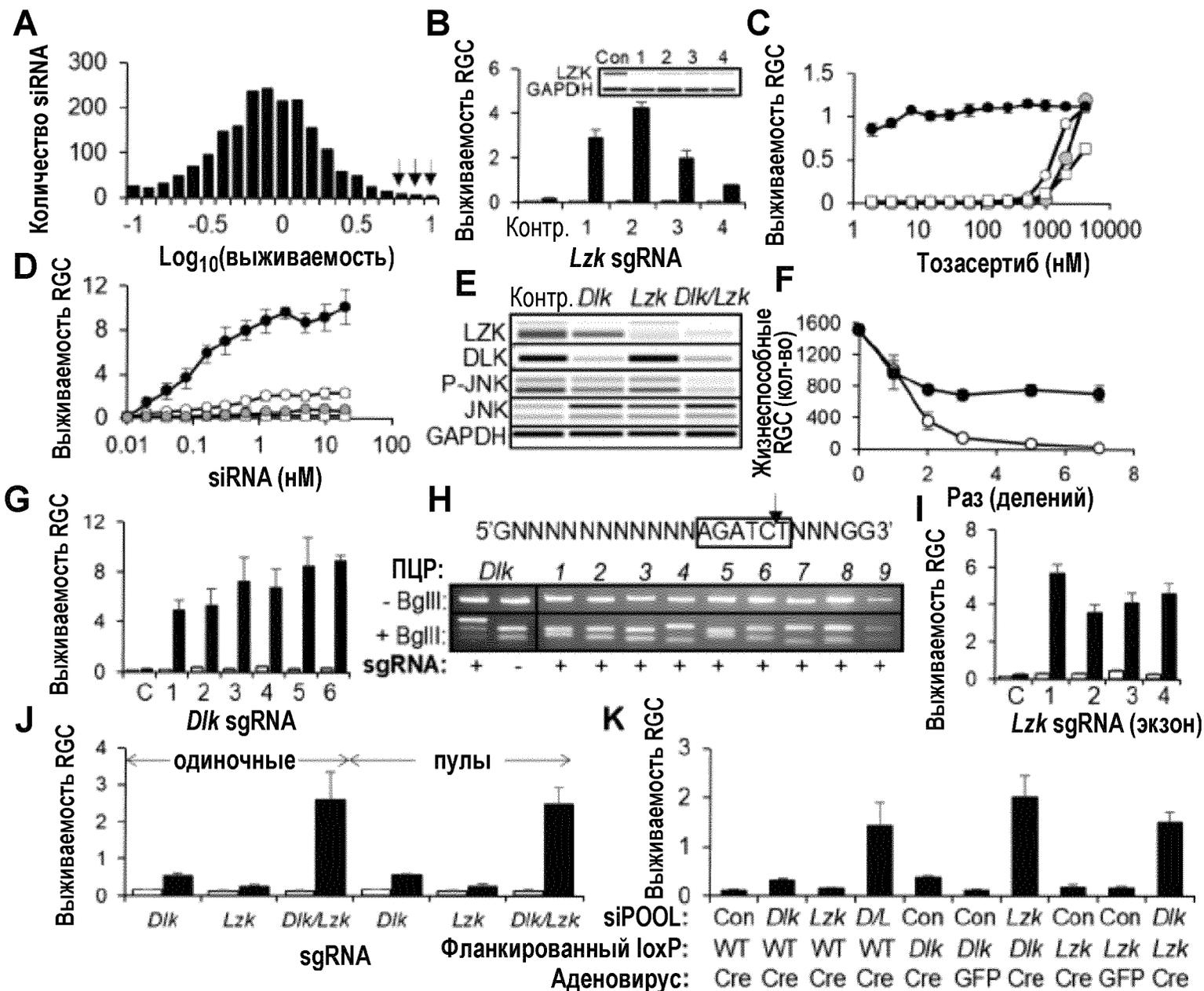
ФИГ.17



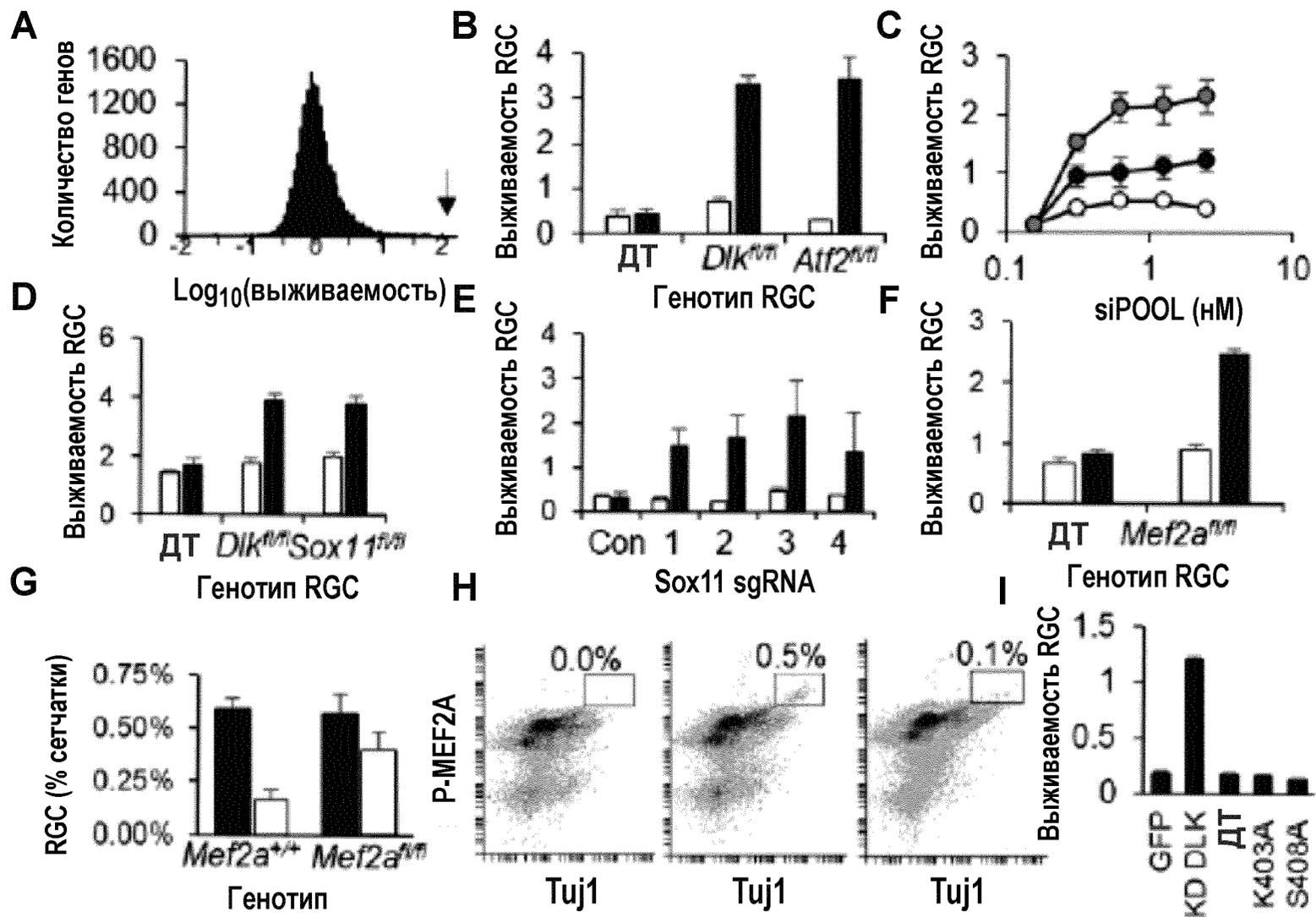
ФИГ.18



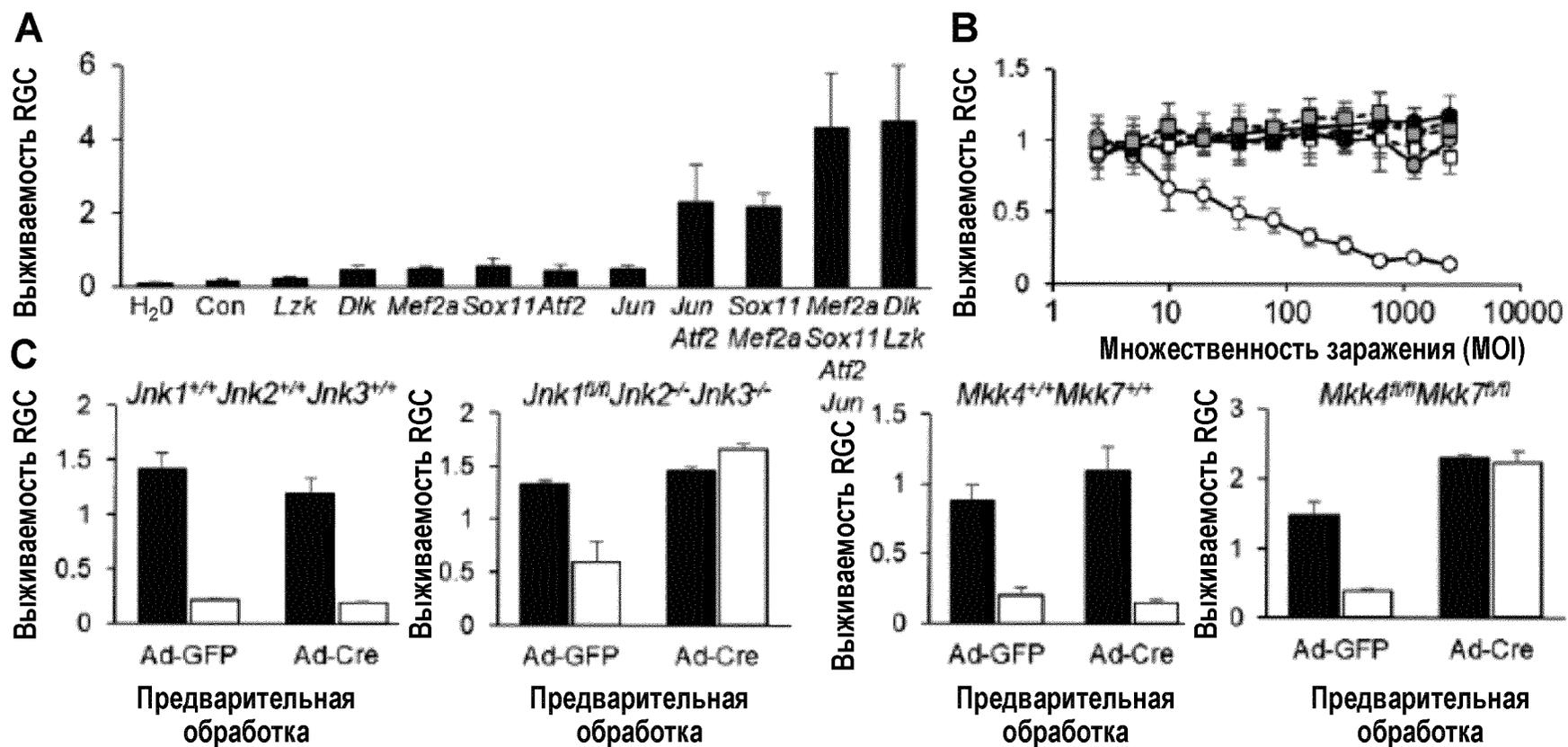
ФИГ.19



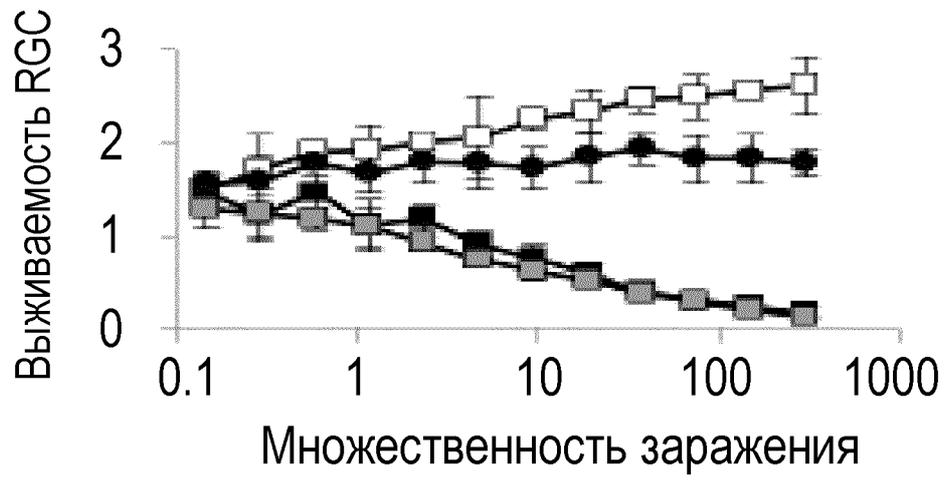
ФИГ.20



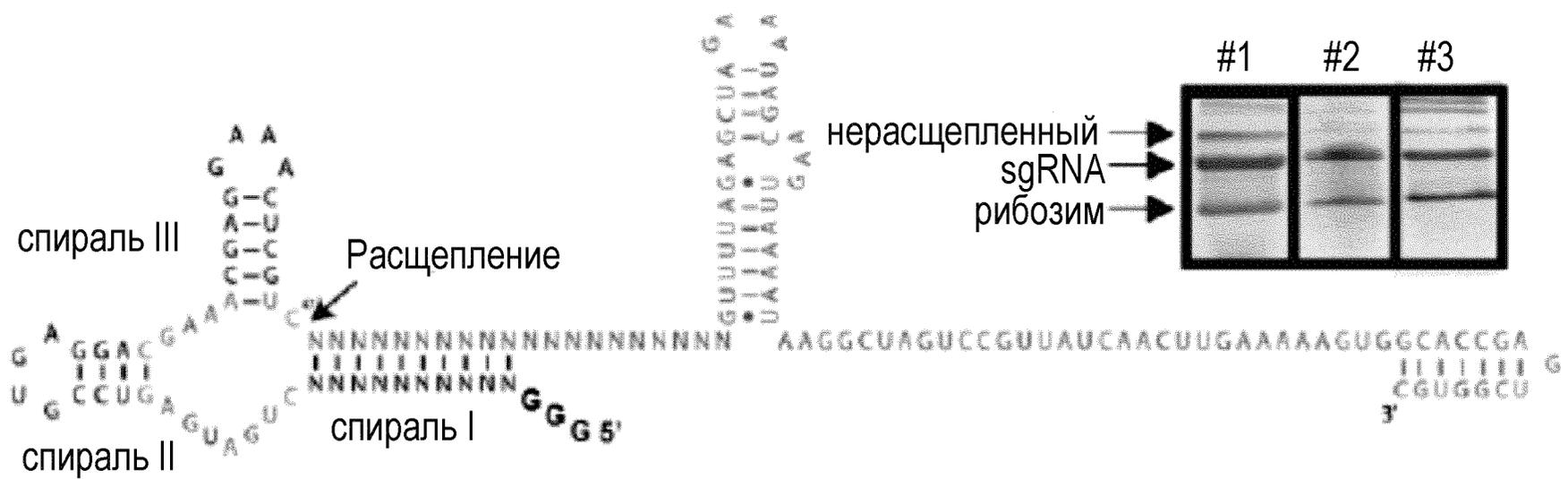
ФИГ.21



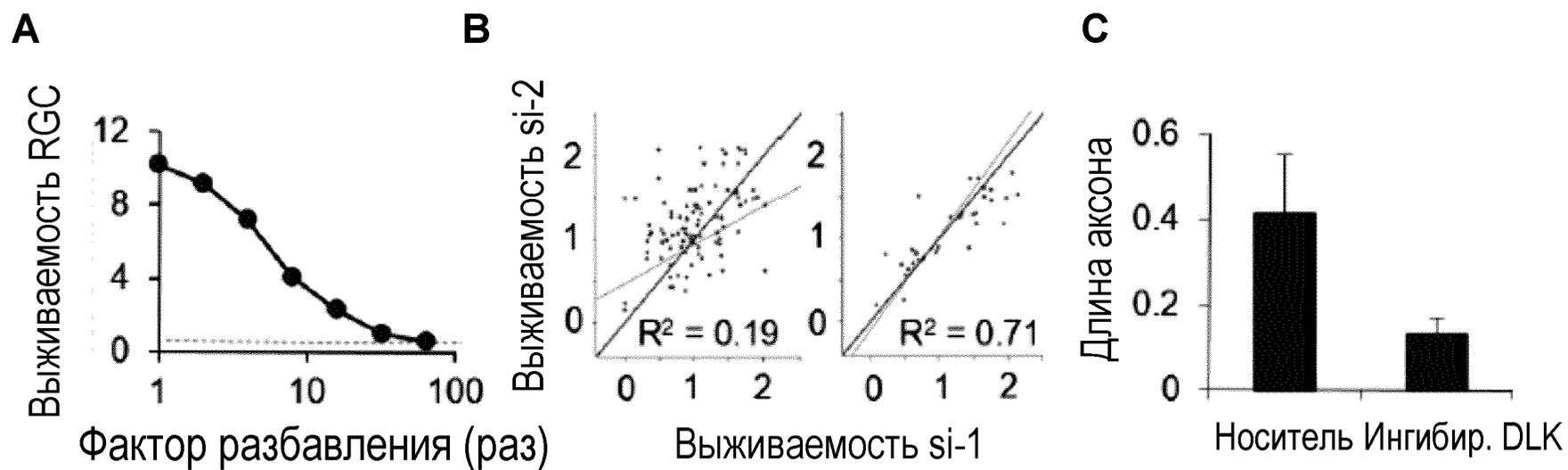
ФИГ.22



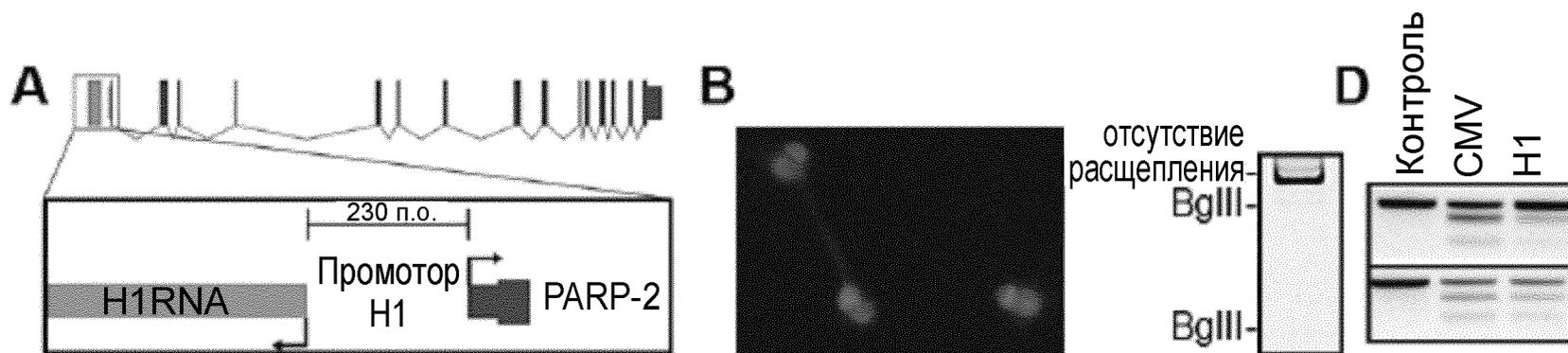
ФИГ.23



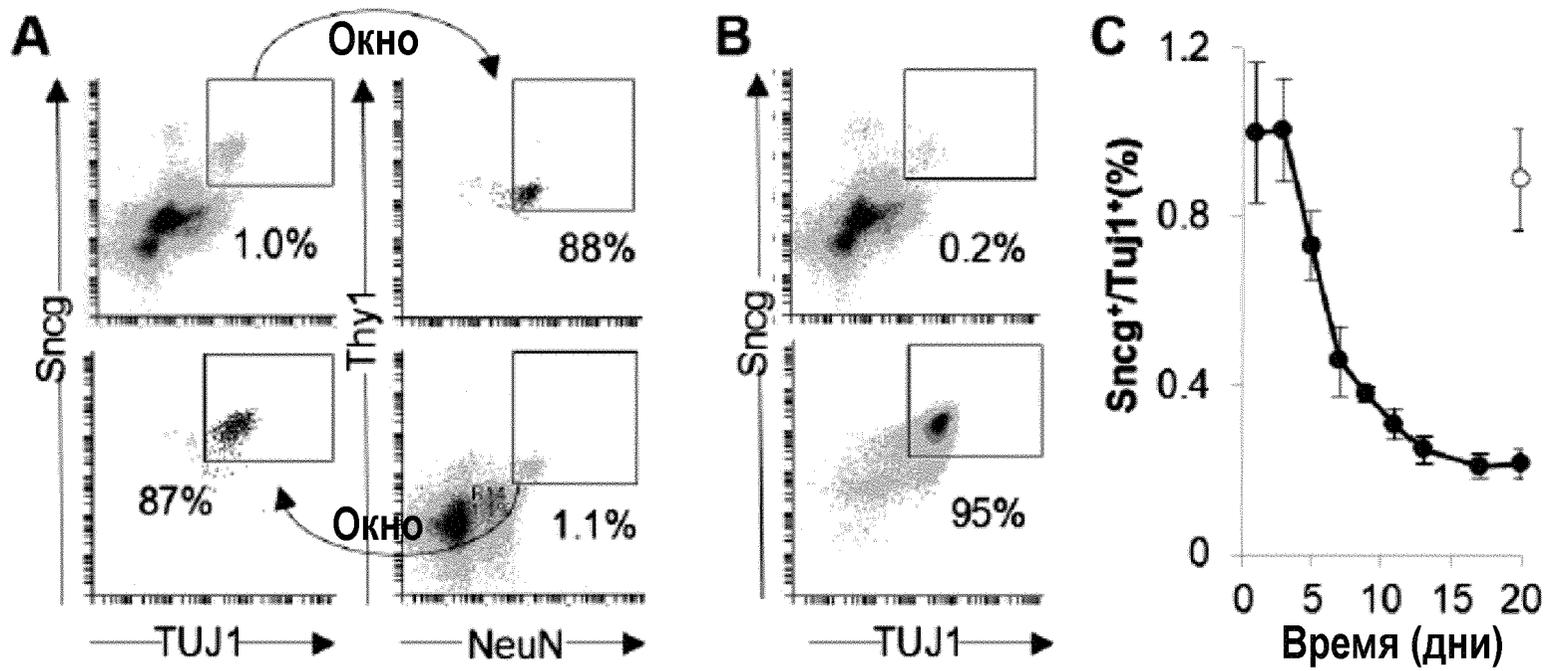
ФИГ.24



ФИГ.25

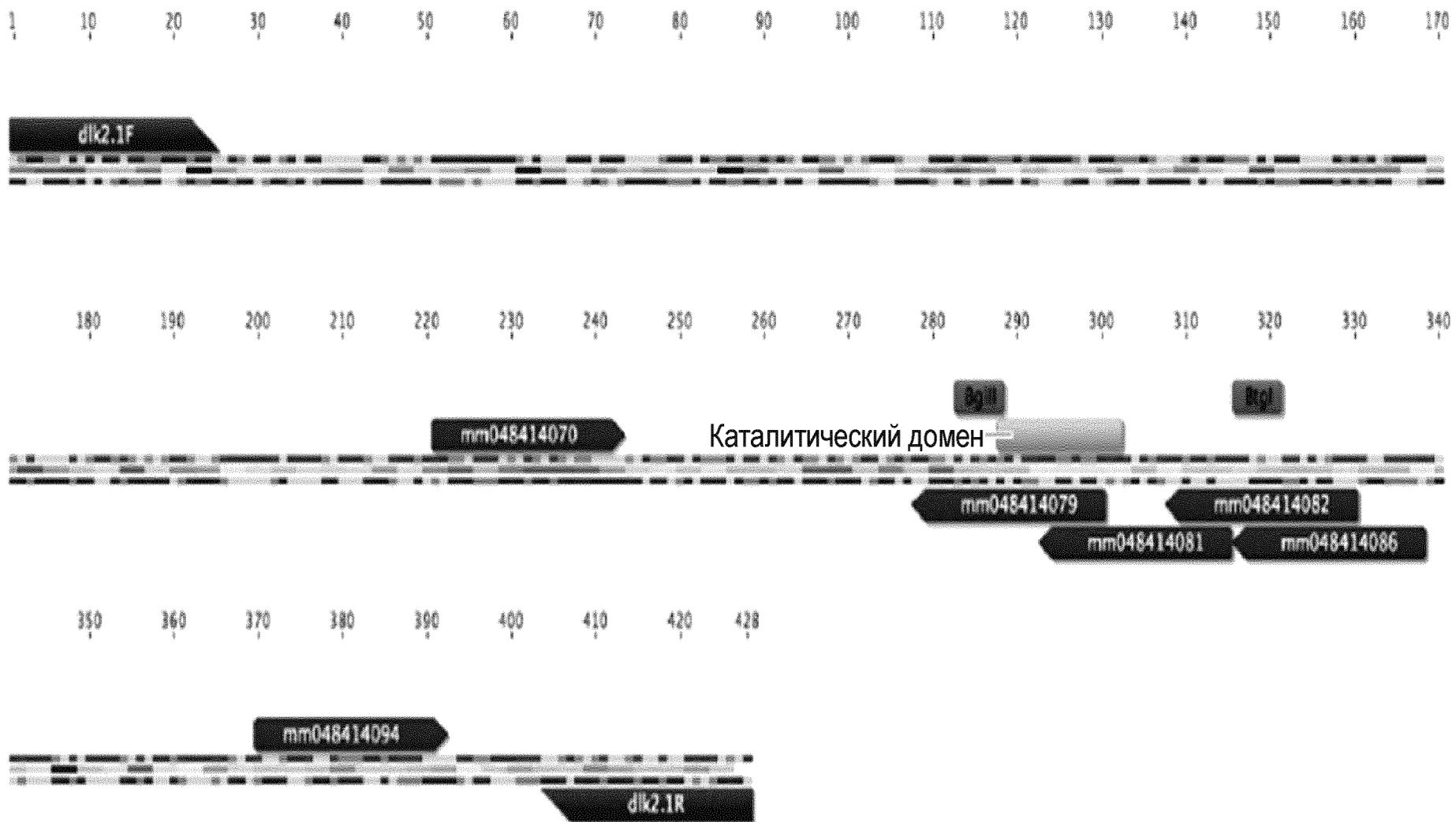


ФИГ.26

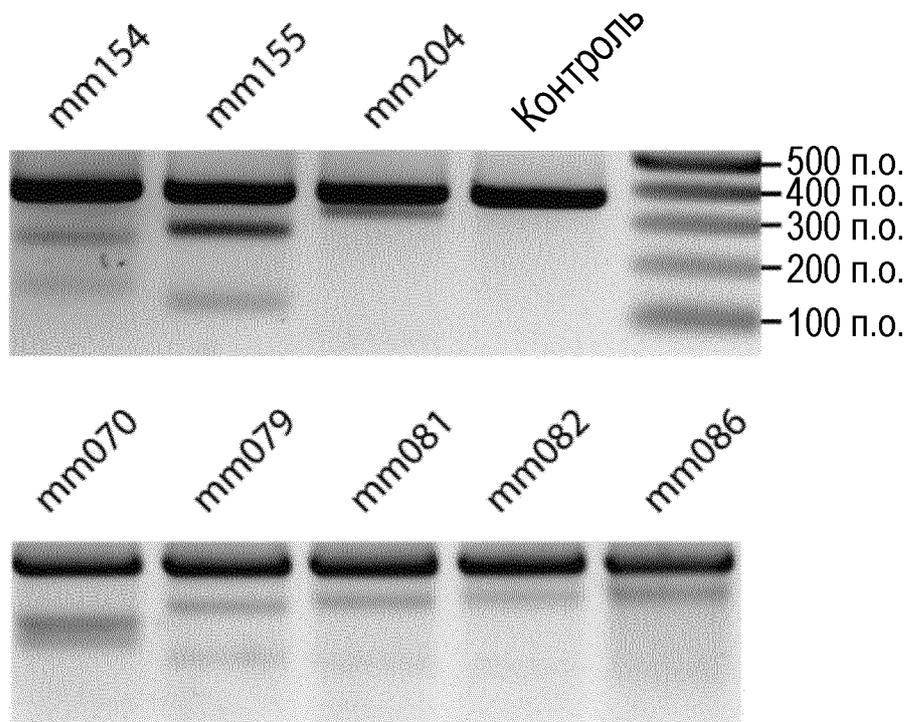




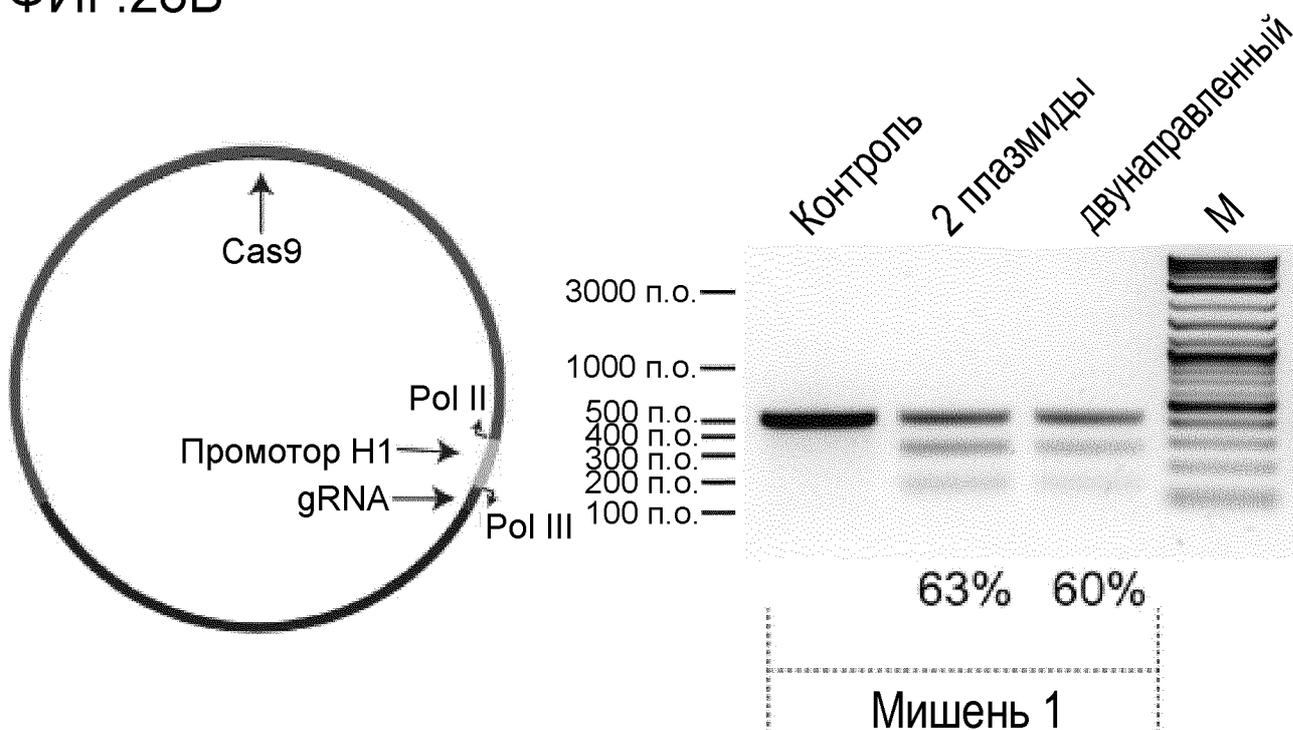
ФИГ.27 (продолжение)



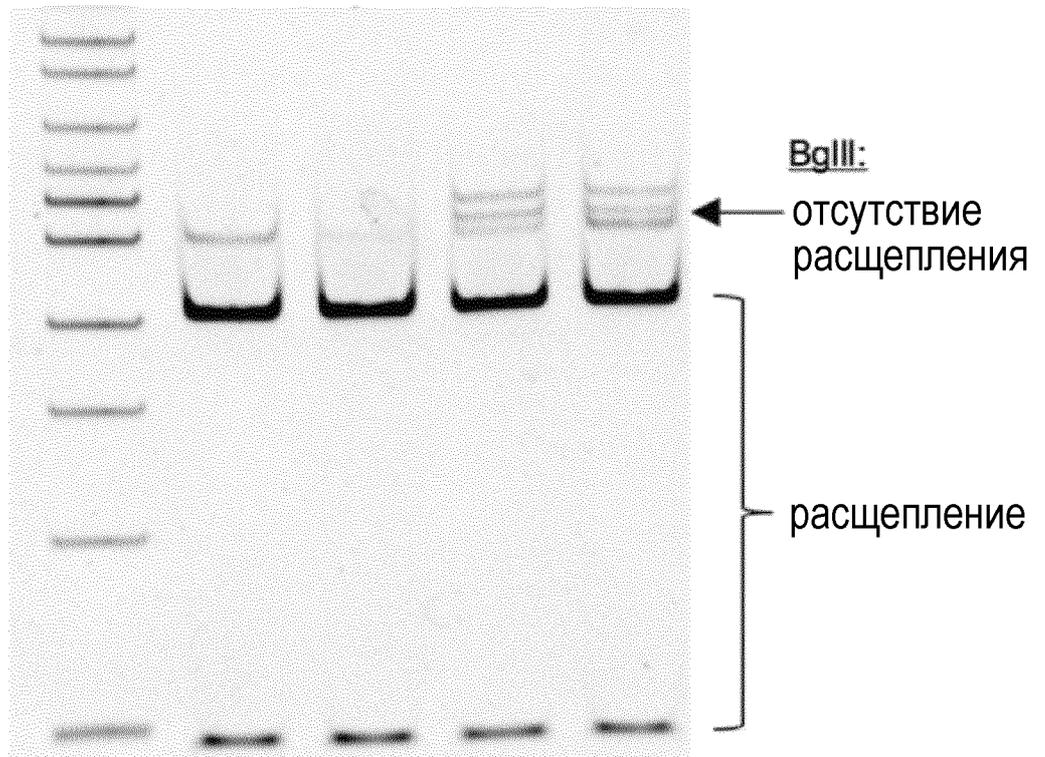
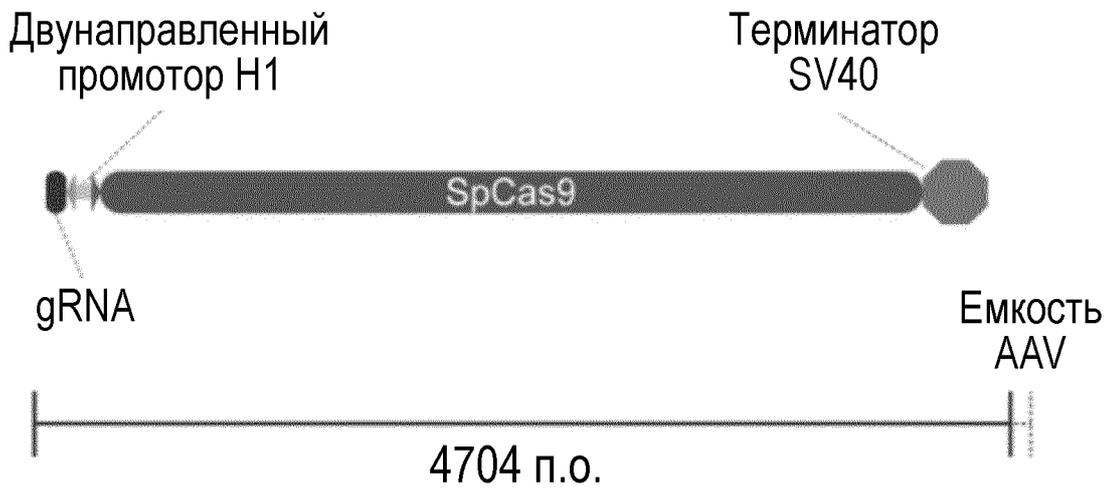
ФИГ.28А



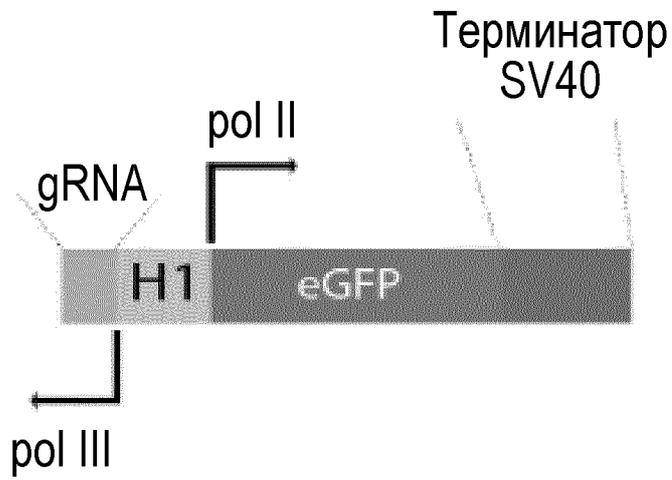
ФИГ.28В



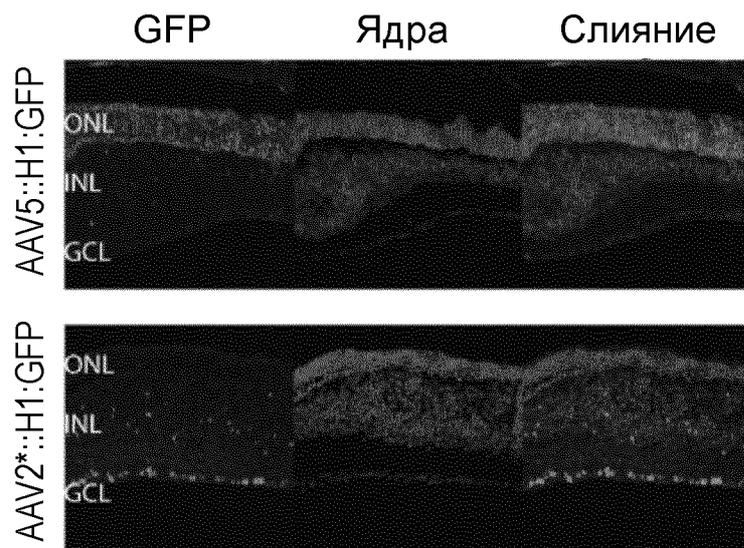
ФИГ.29



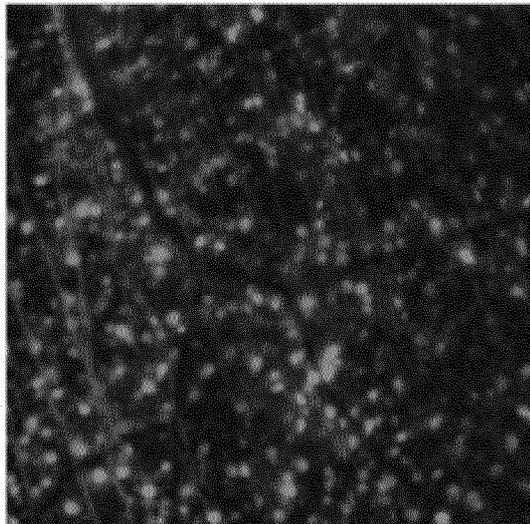
ФИГ.30А



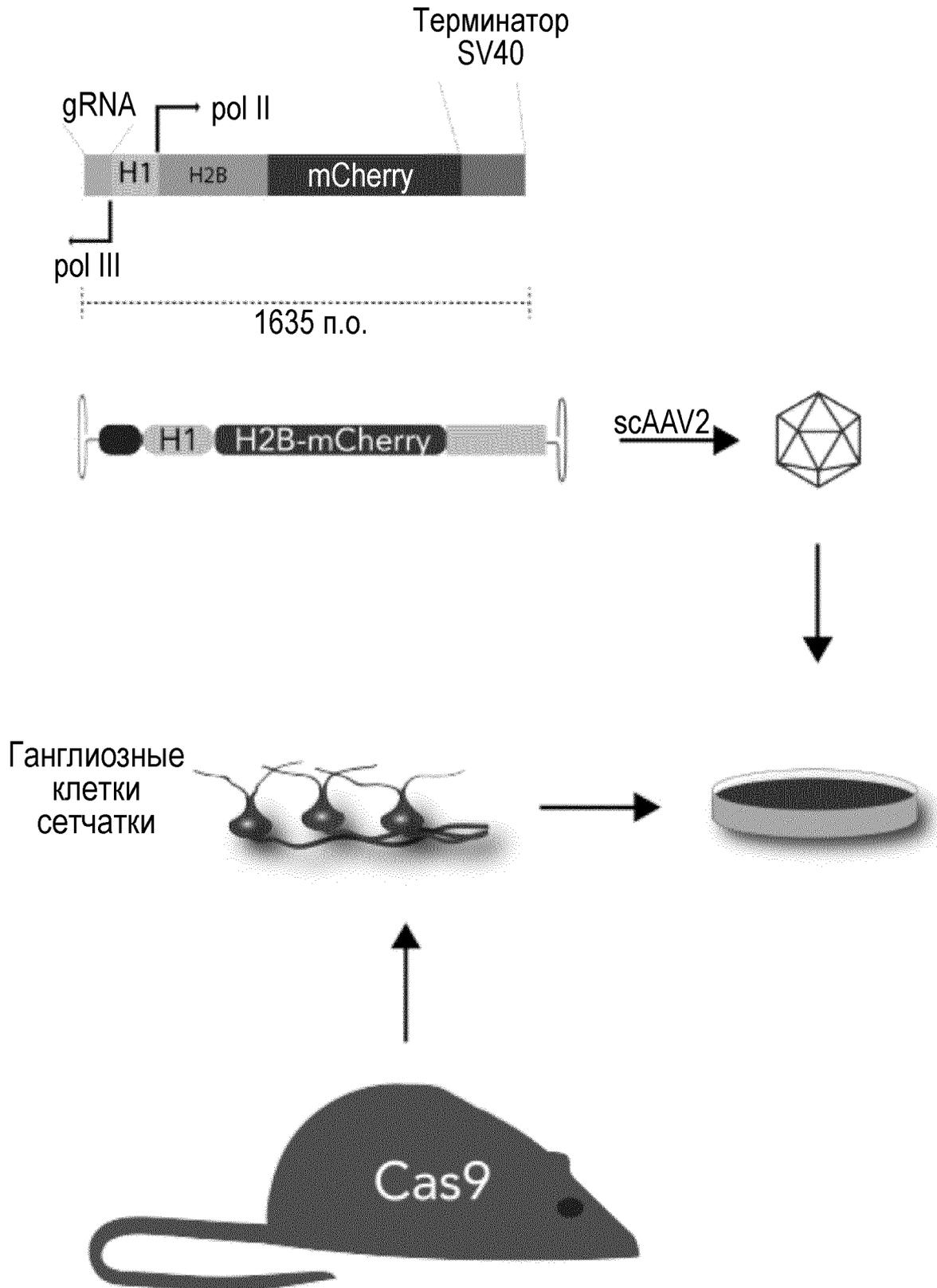
ФИГ.30В



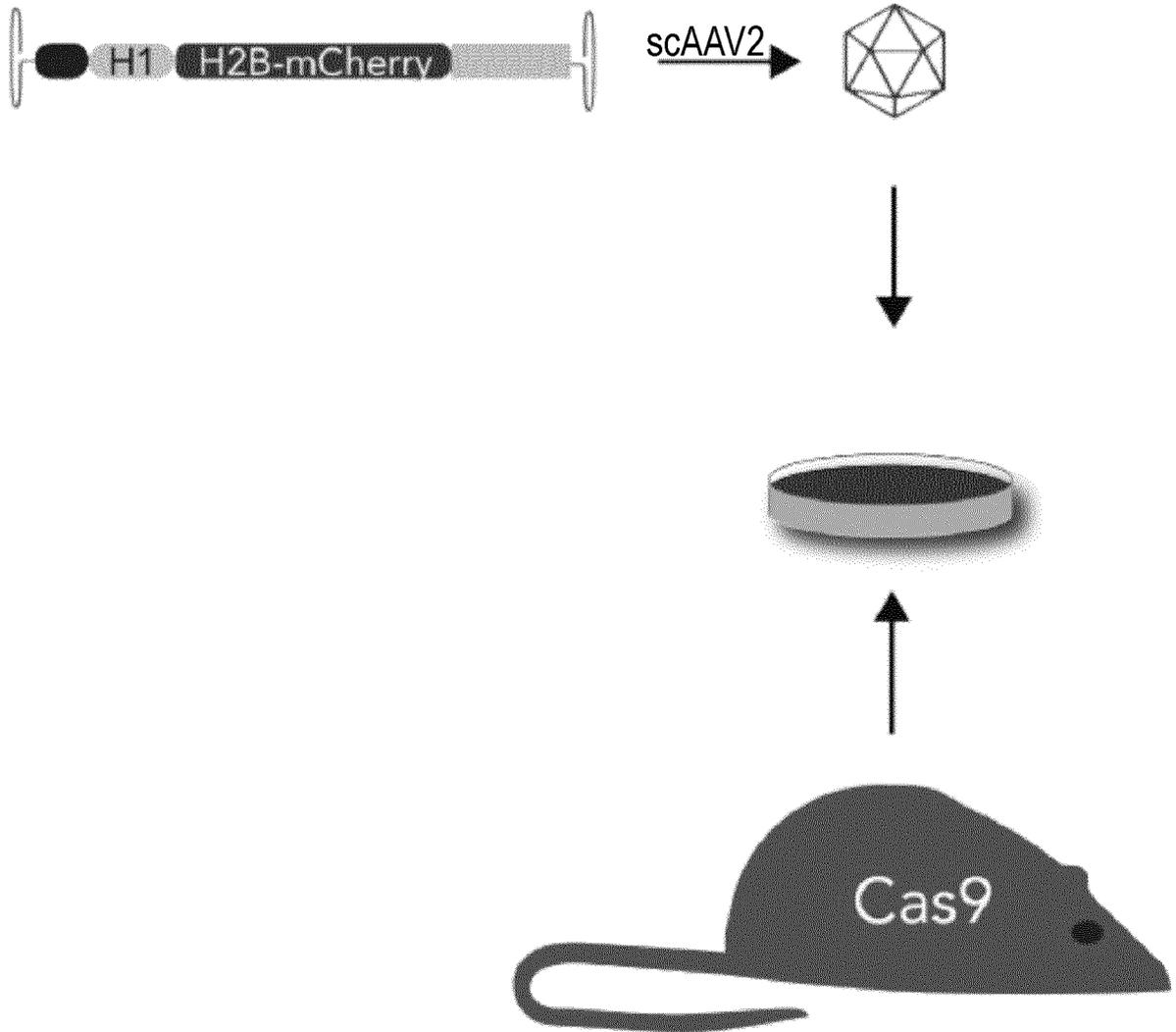
ФИГ.30С



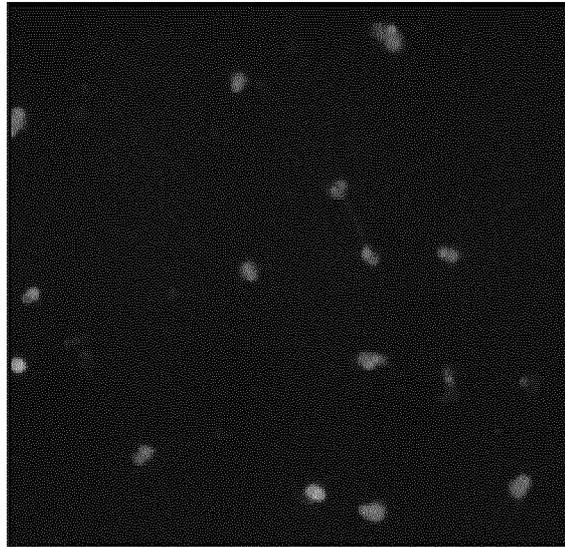
ФИГ.31А



ФИГ.31А (продолжение)

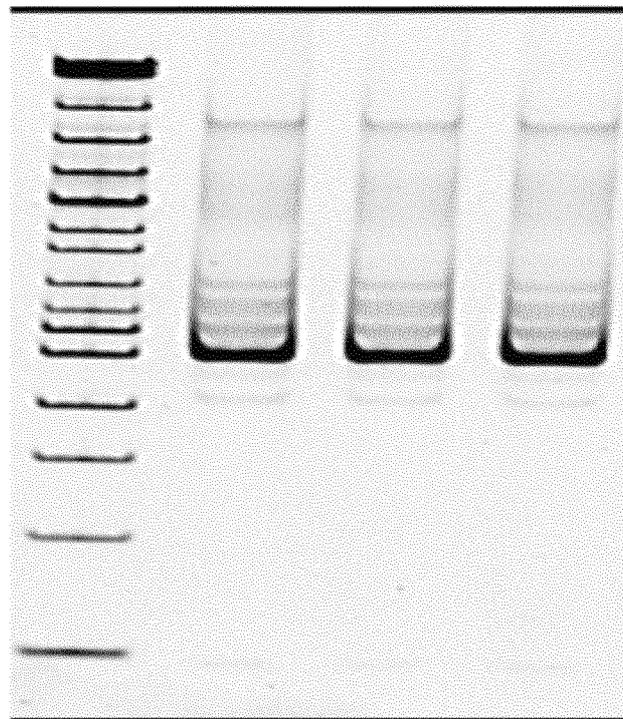


ФИГ.31В



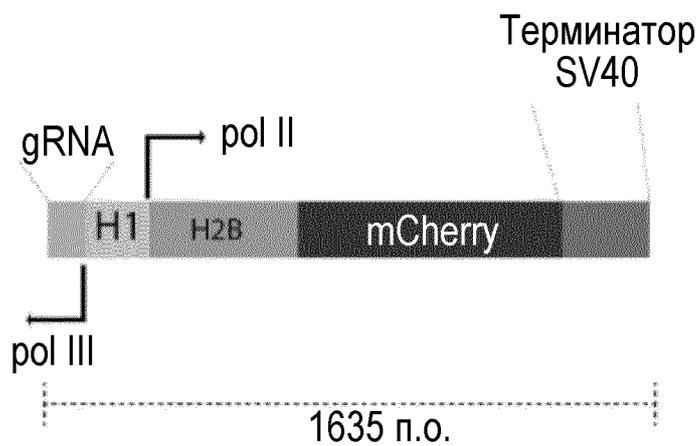
Трансдукция

ФИГ.31С

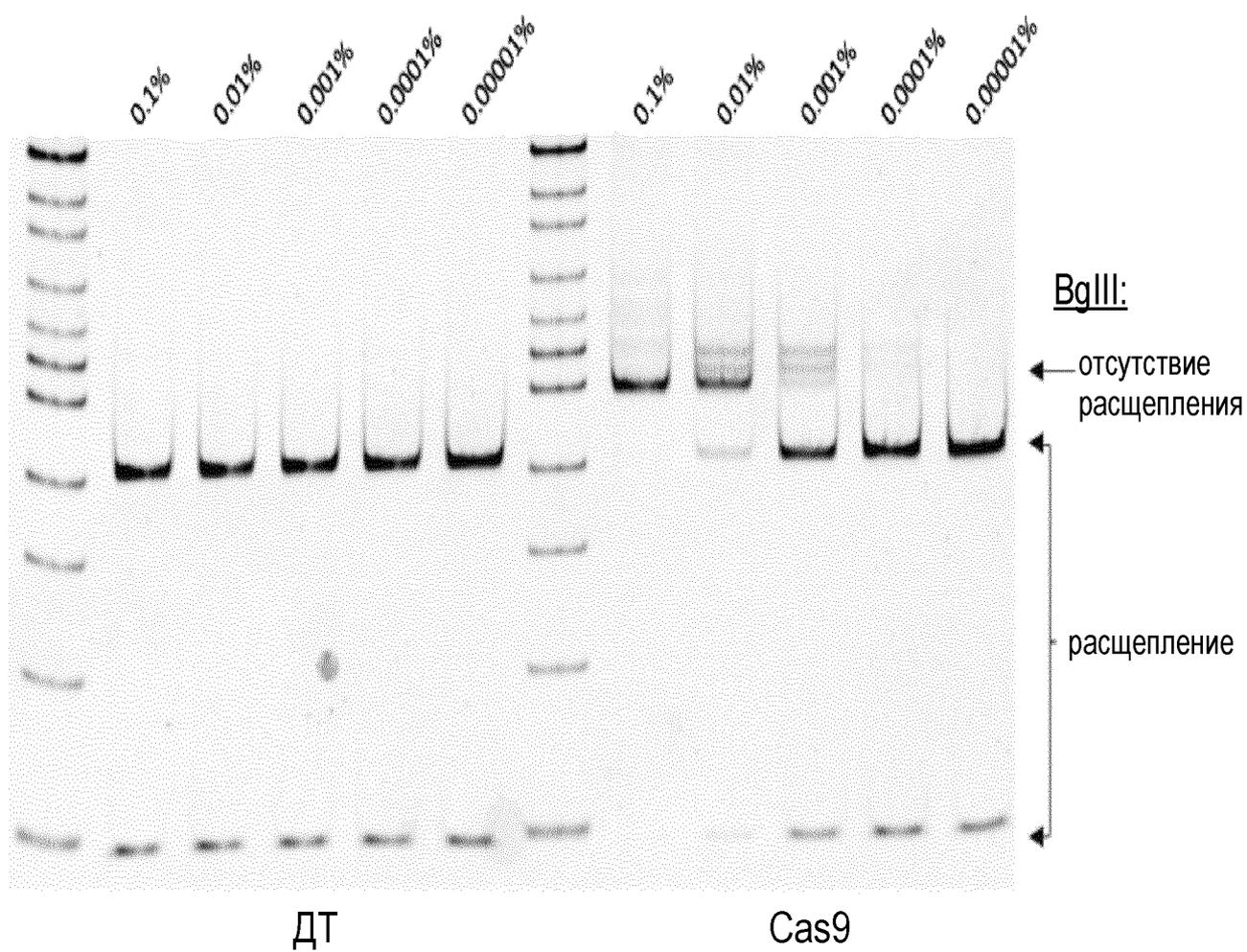


Редактирование гена

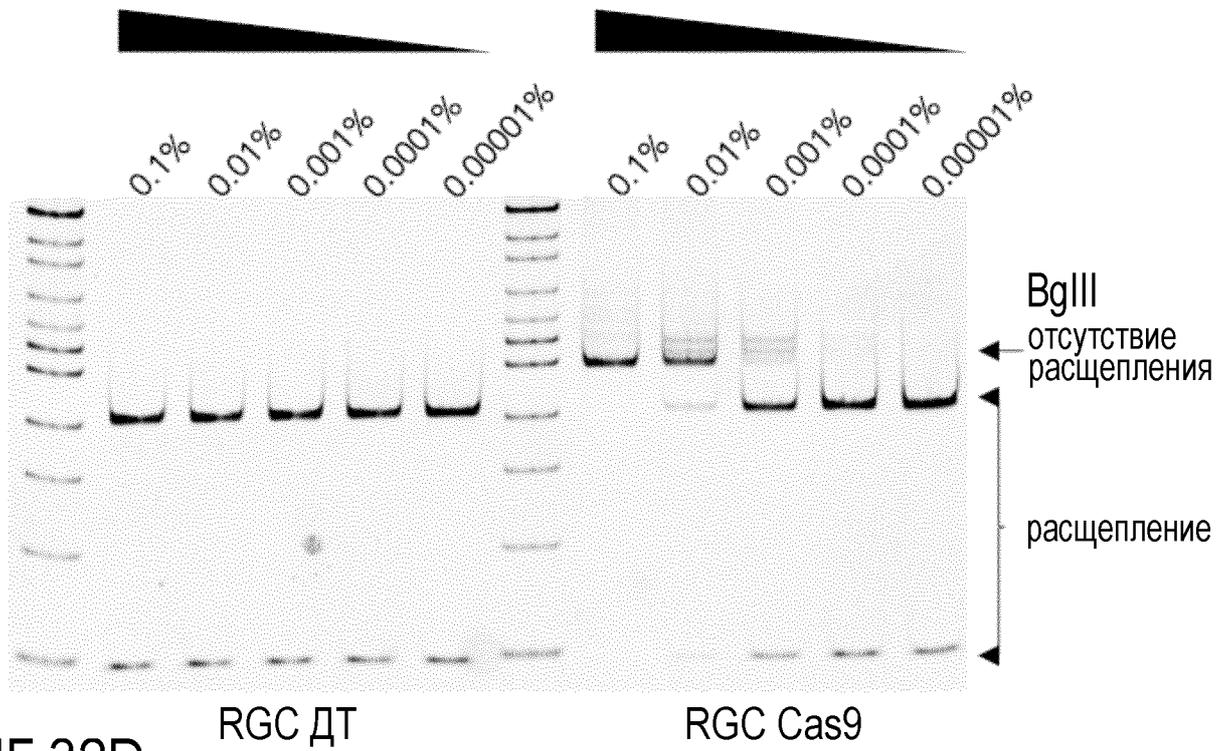
ФИГ.32А



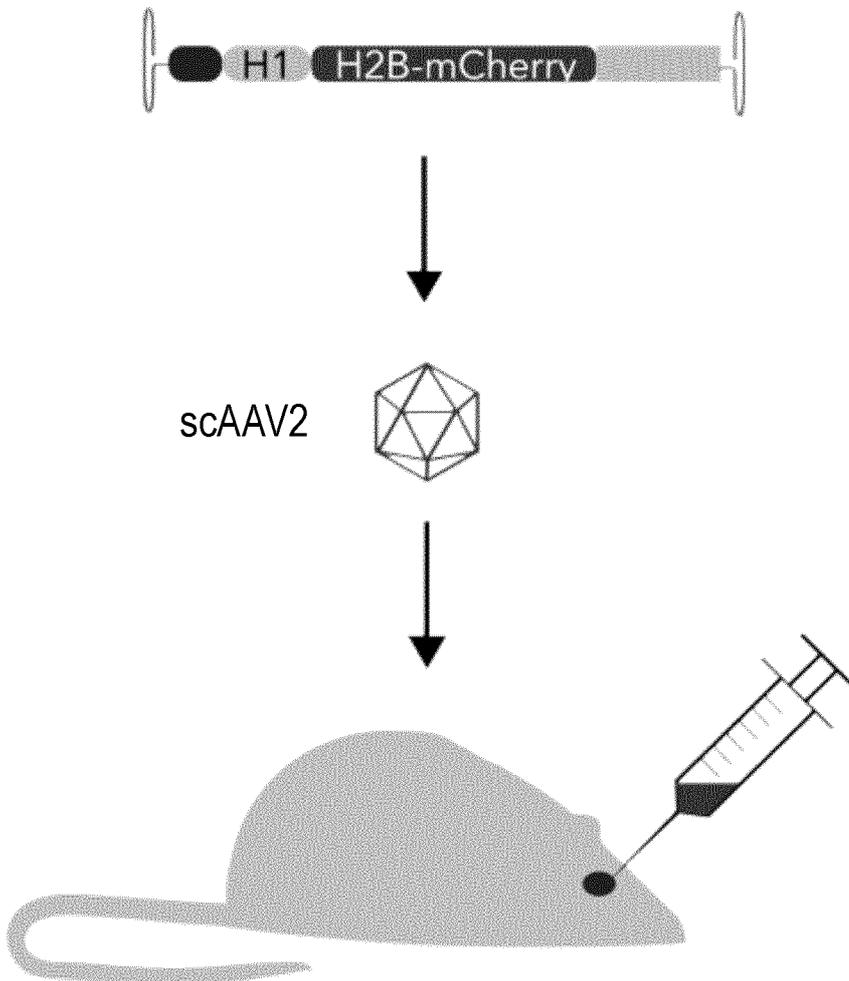
ФИГ.32В



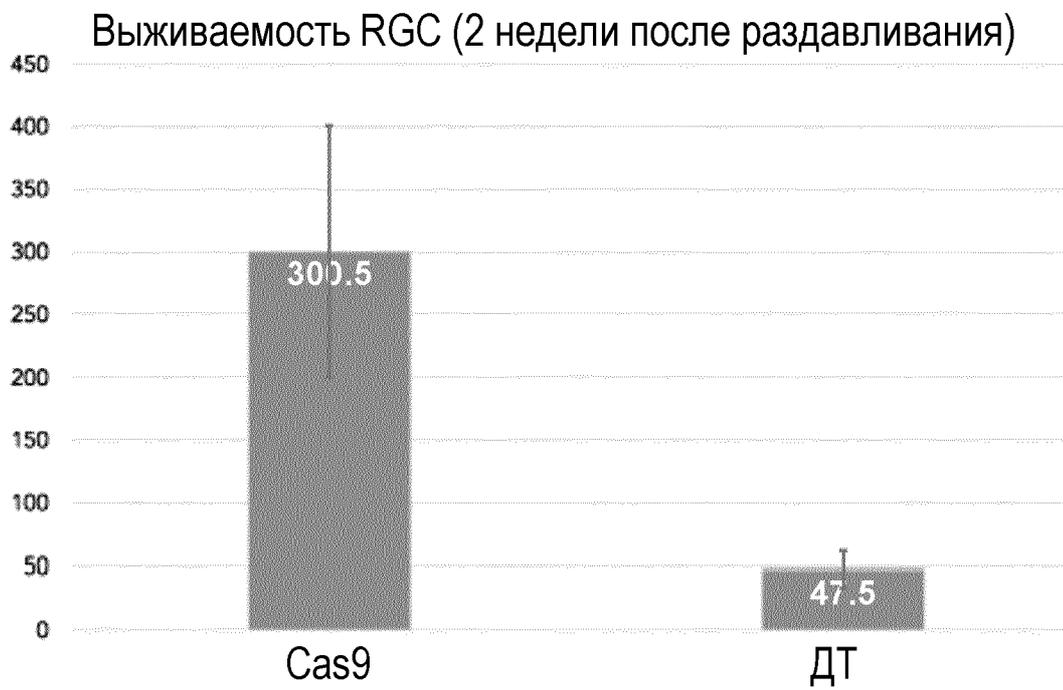
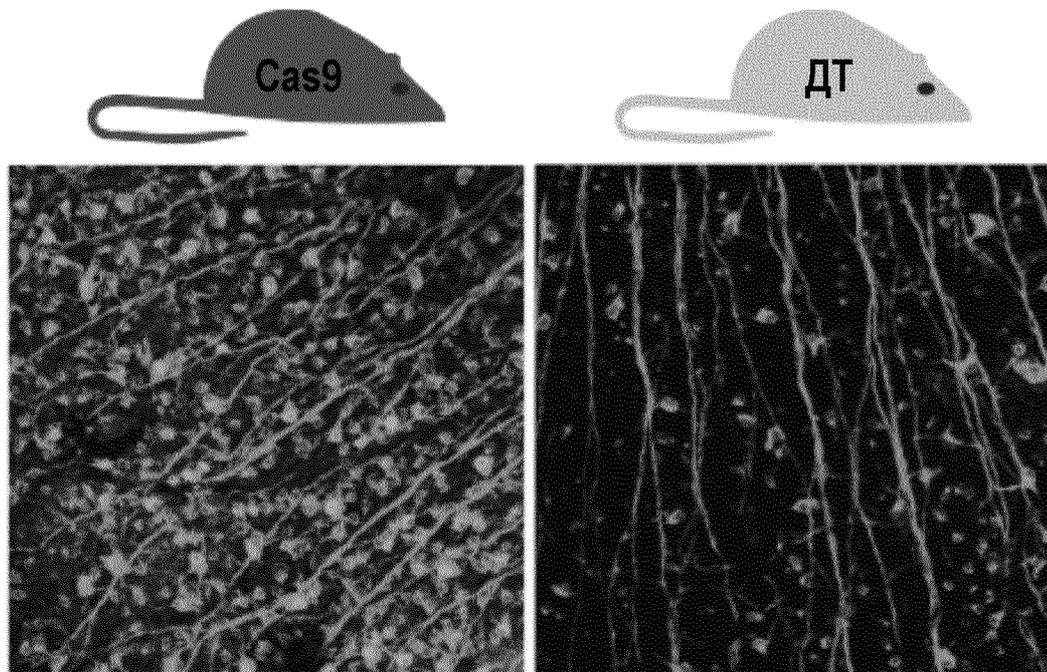
ФИГ.32С



ФИГ.32D



ФИГ.32Е



ФИГ.33А

Ленти-  
проводник:

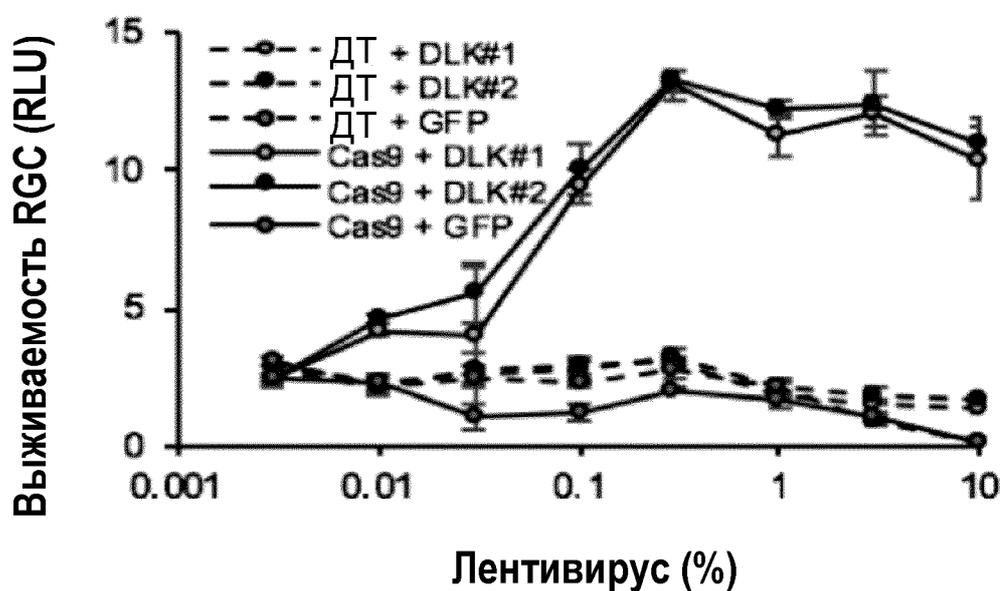


Лентивирусная конструкция, используемая для доставки CRISPR-gRNA

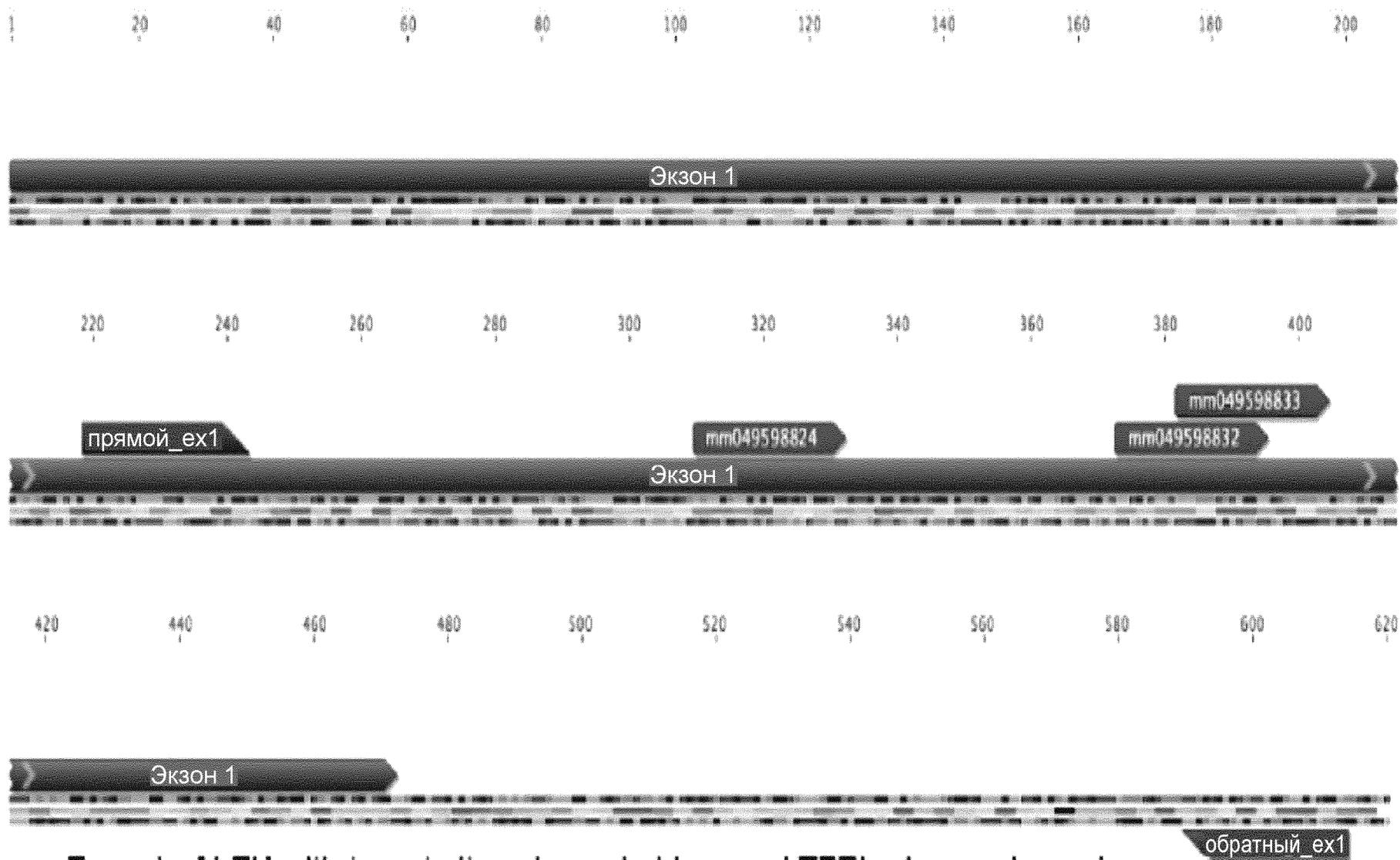
ФИГ.33В



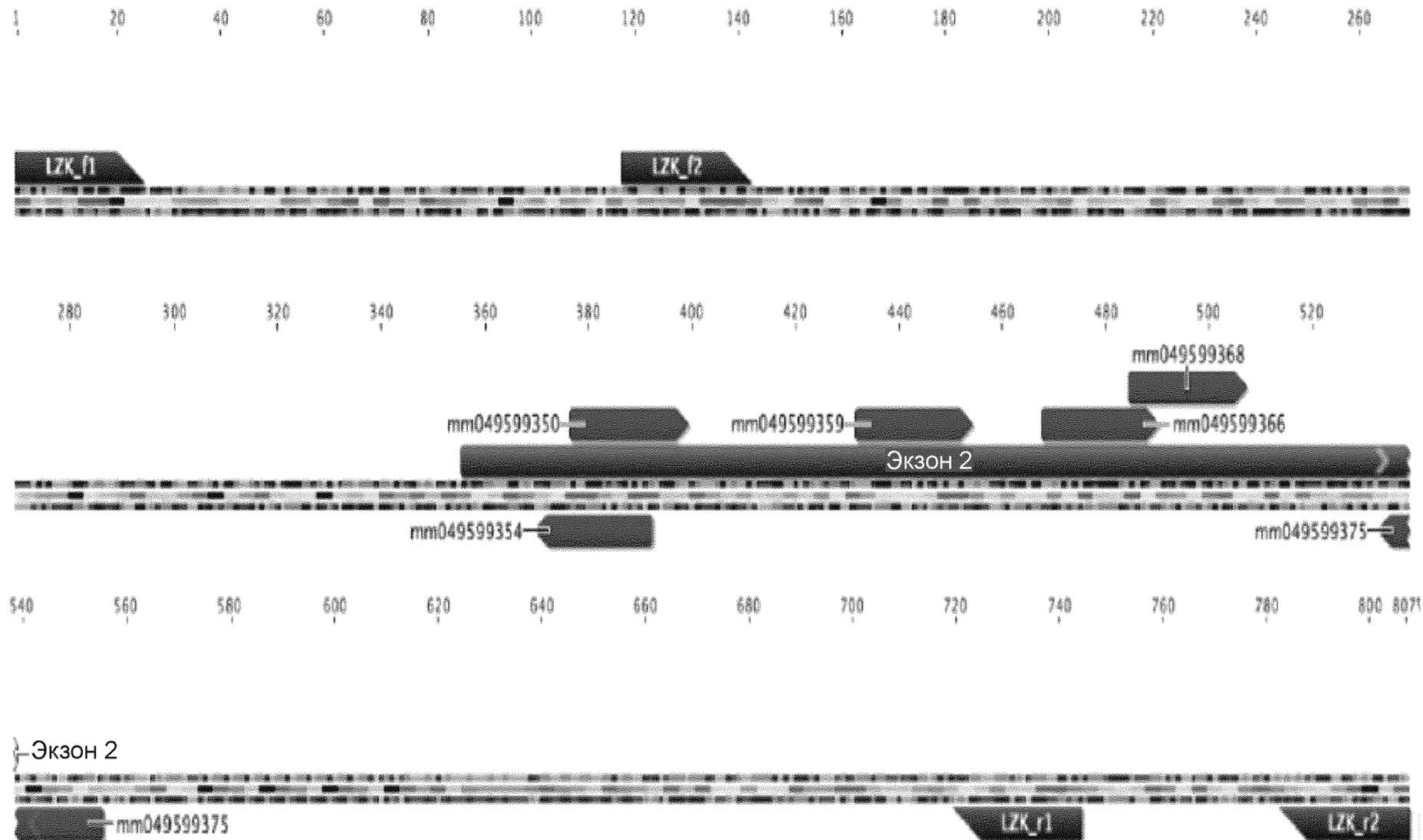
ФИГ.33С



ФИГ.34А

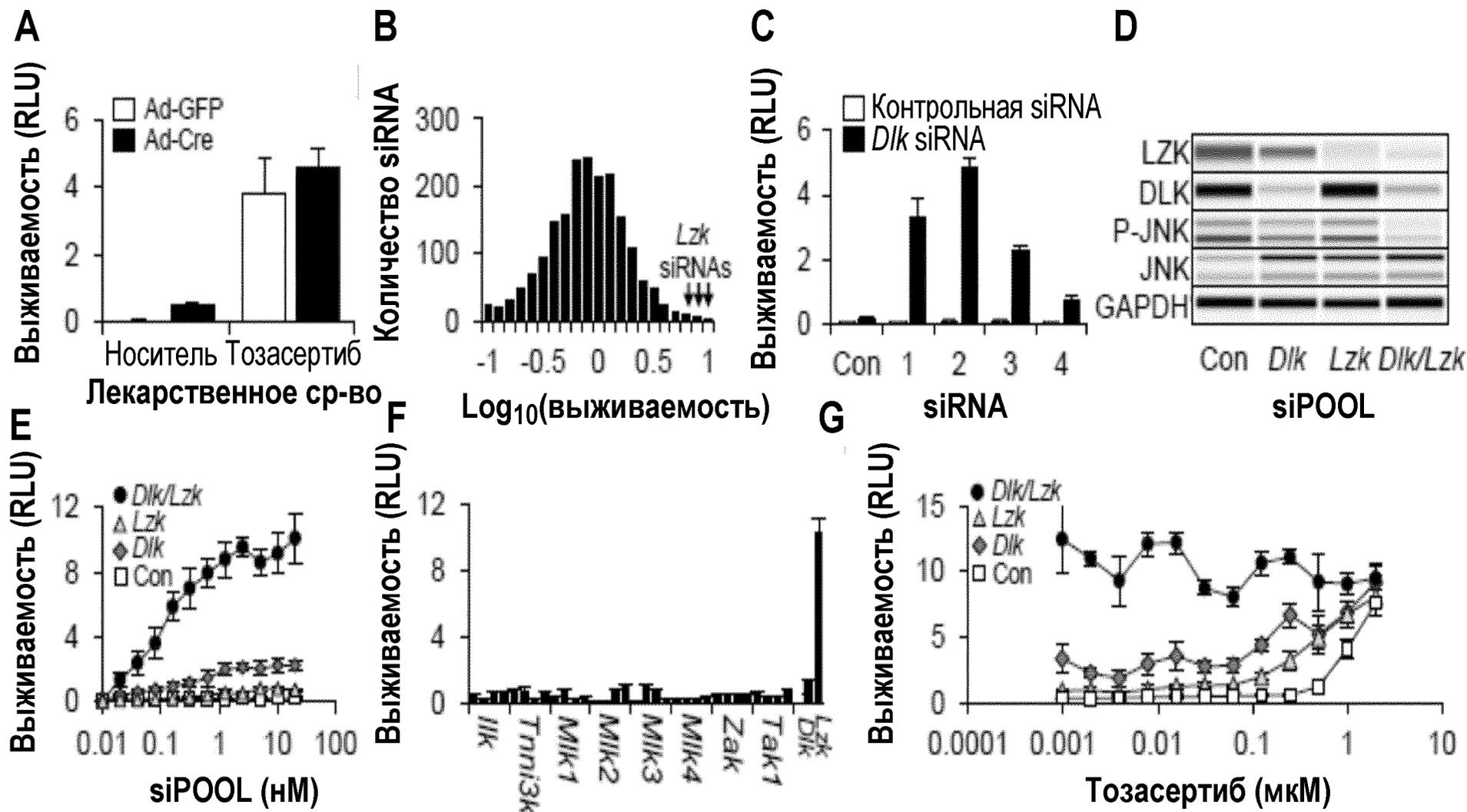


# ФИГ.34В

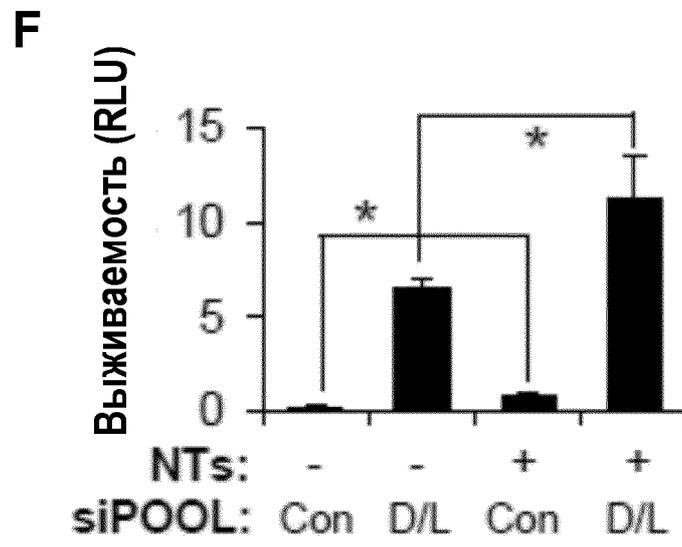


40/103

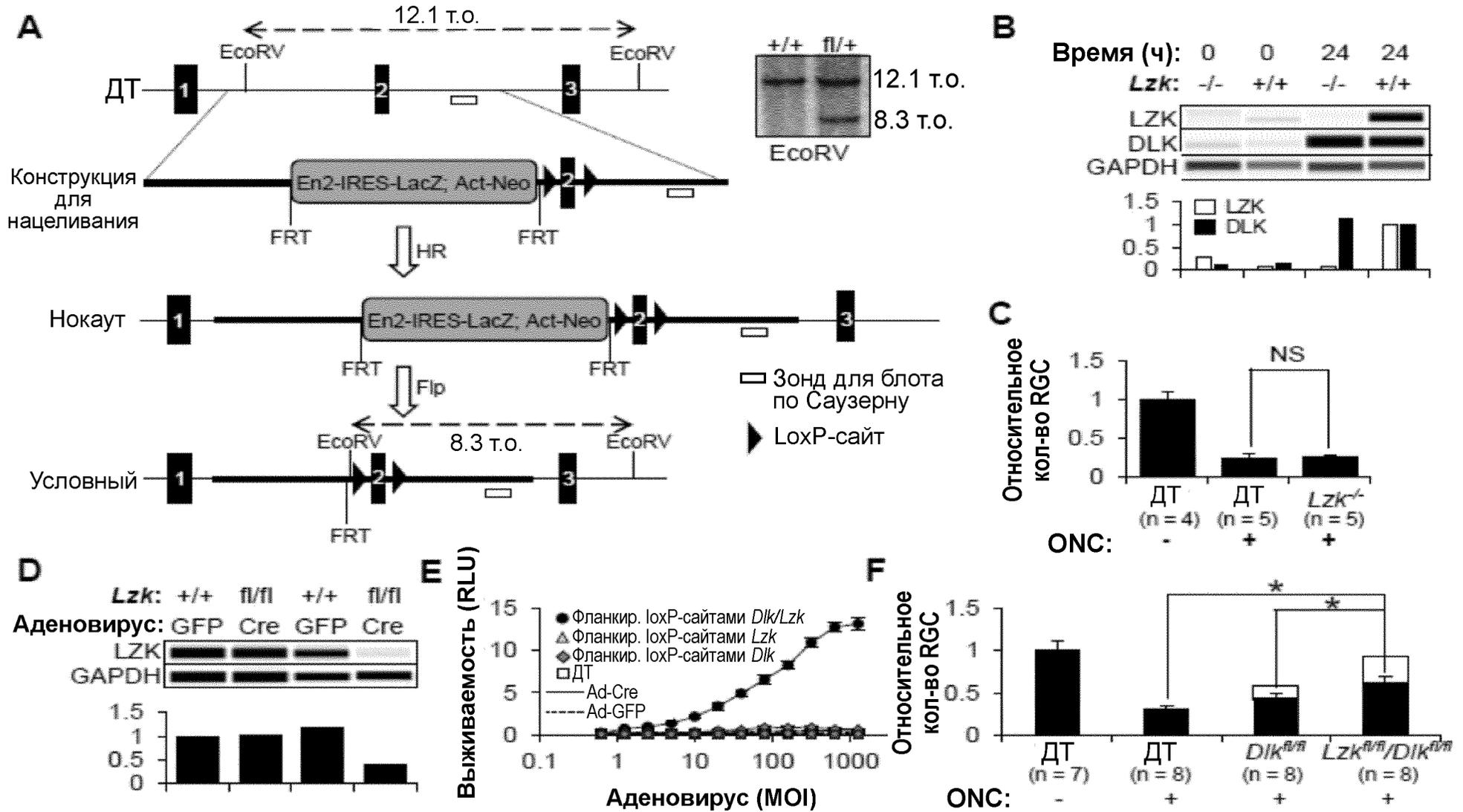
ФИГ.35



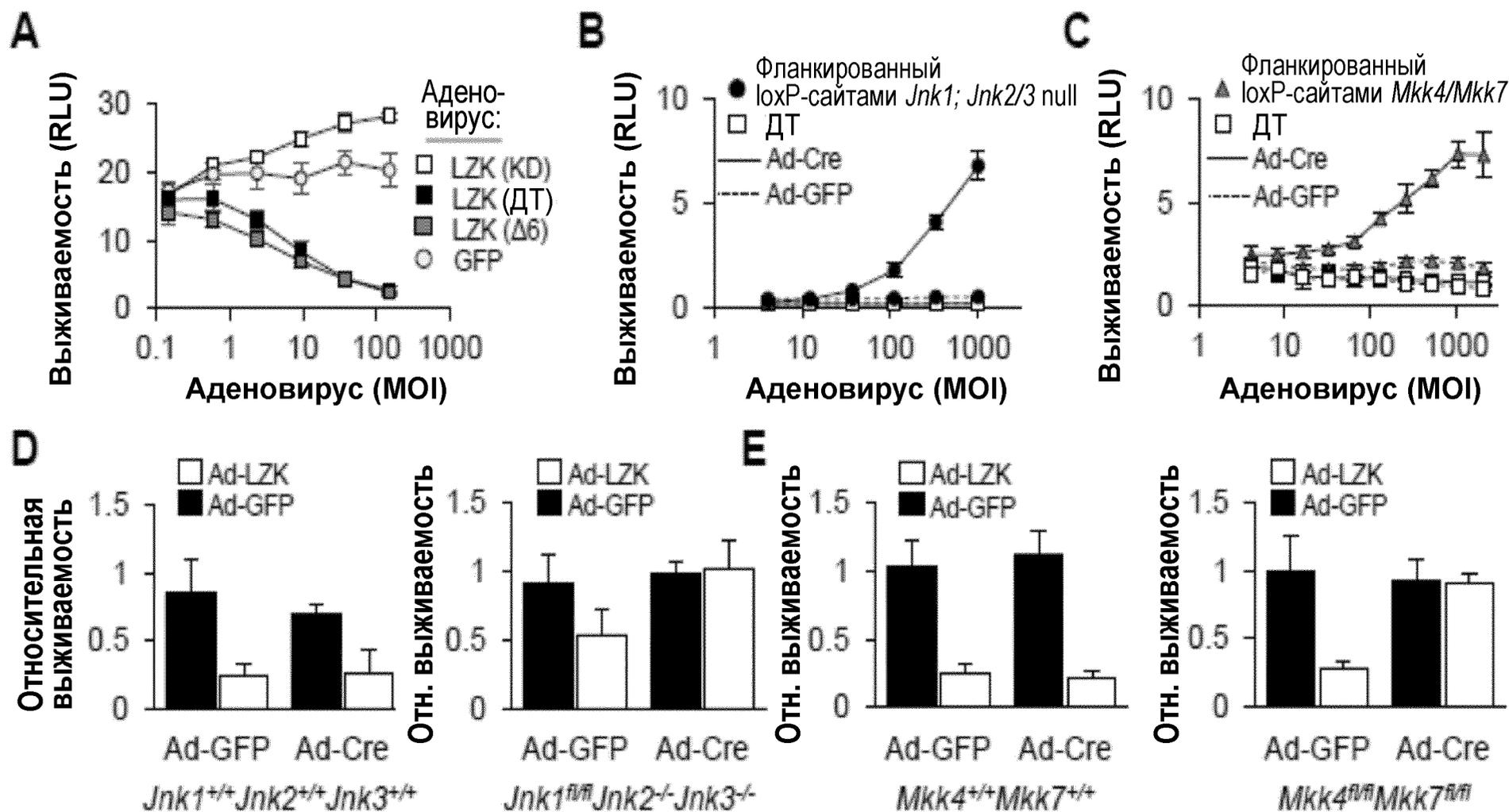
ФИГ.35Н



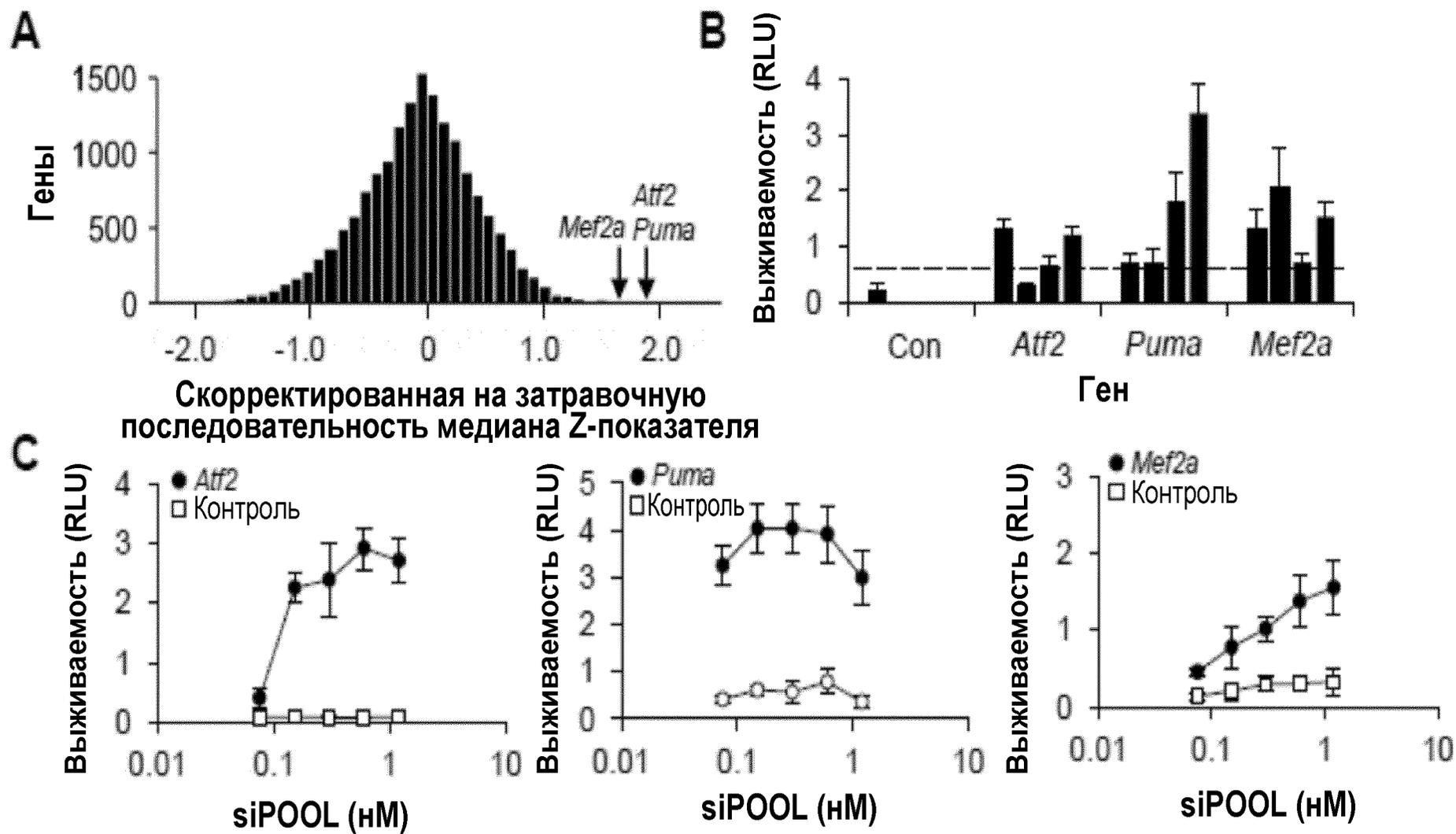
ФИГ.36



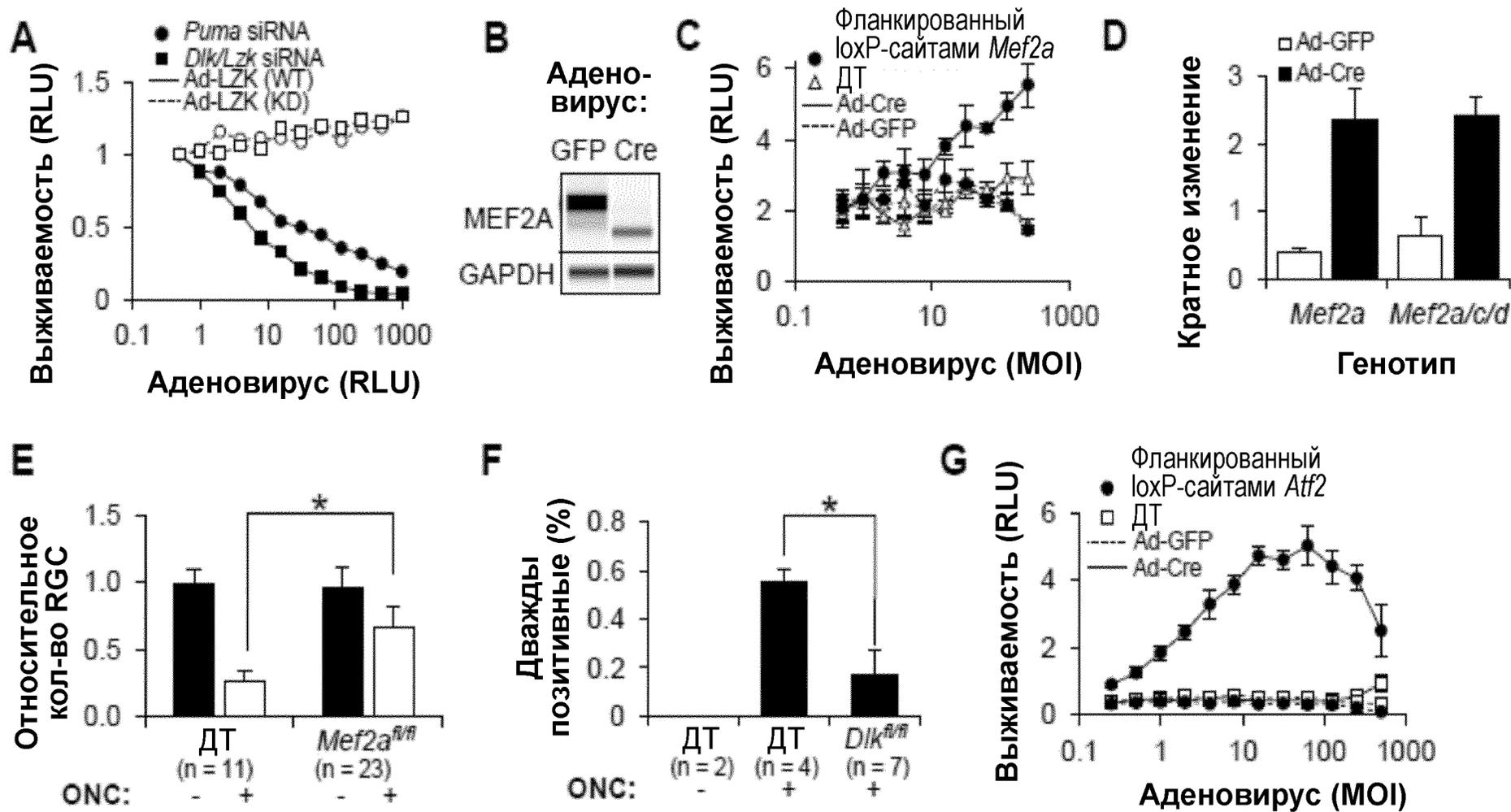
ФИГ.37



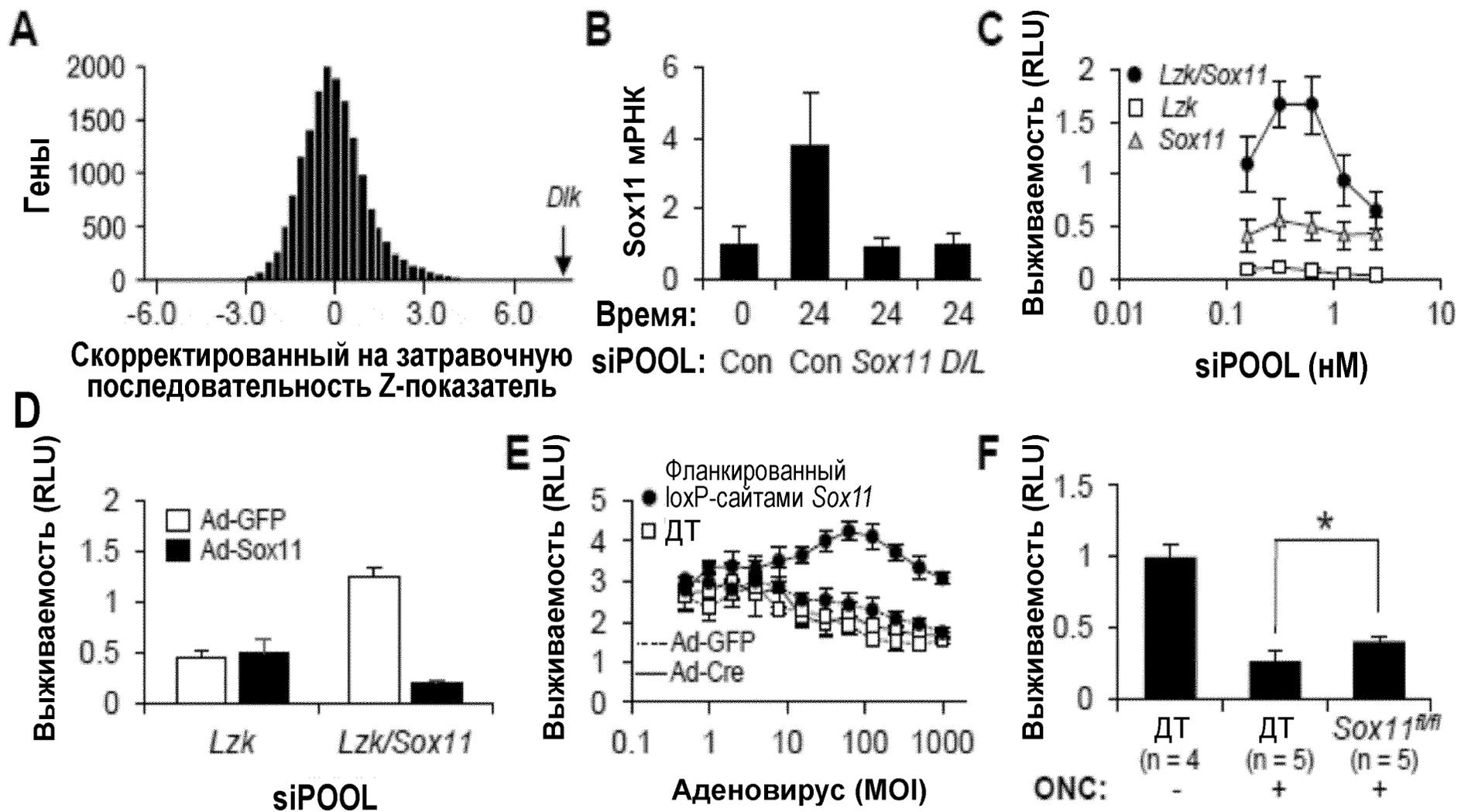
ФИГ.38



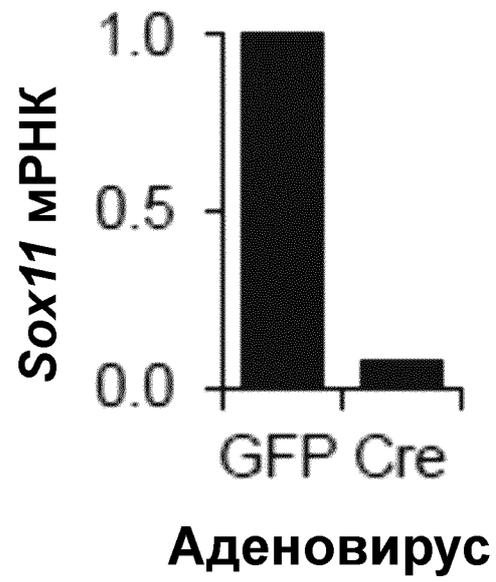
ФИГ.39



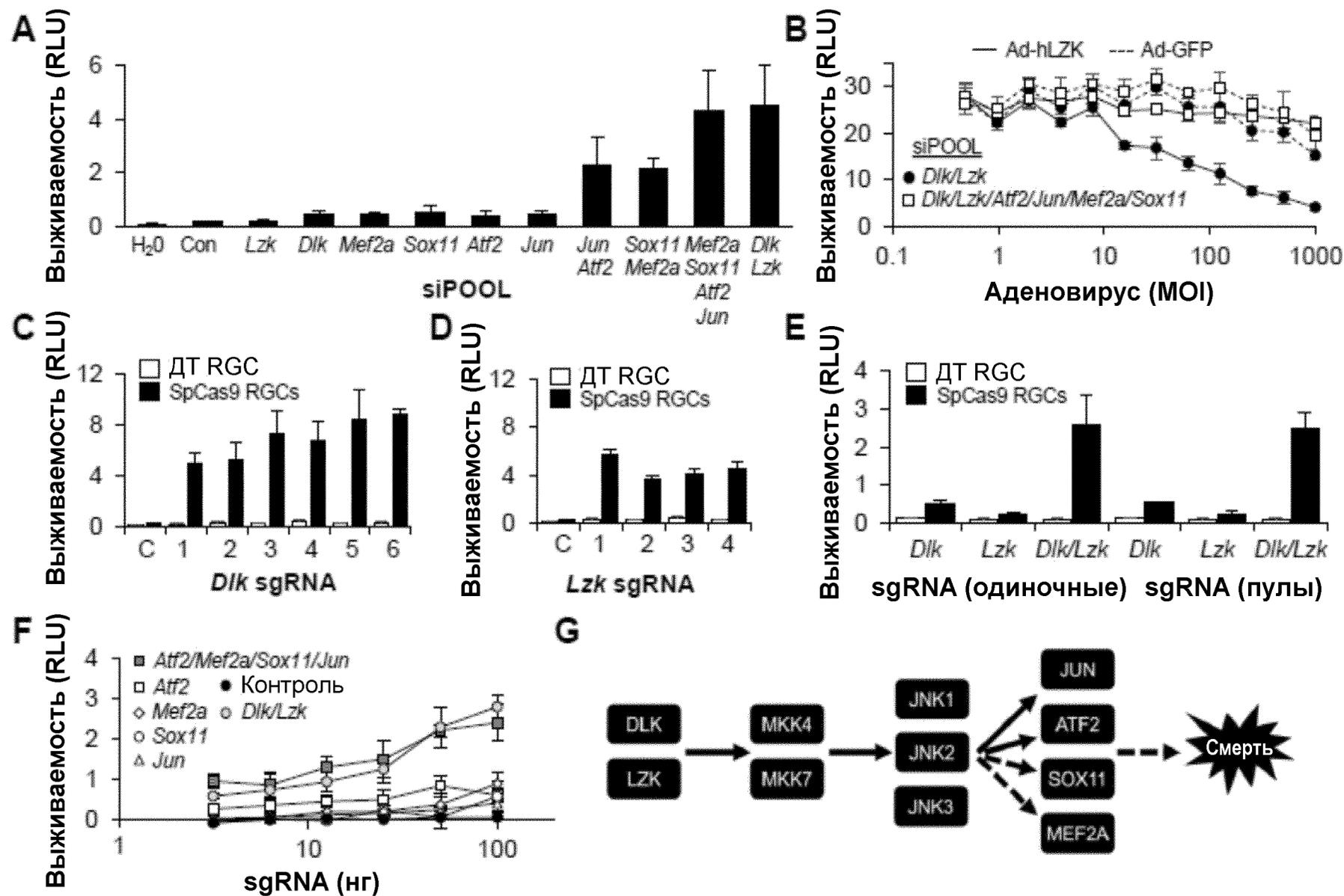
ФИГ.40



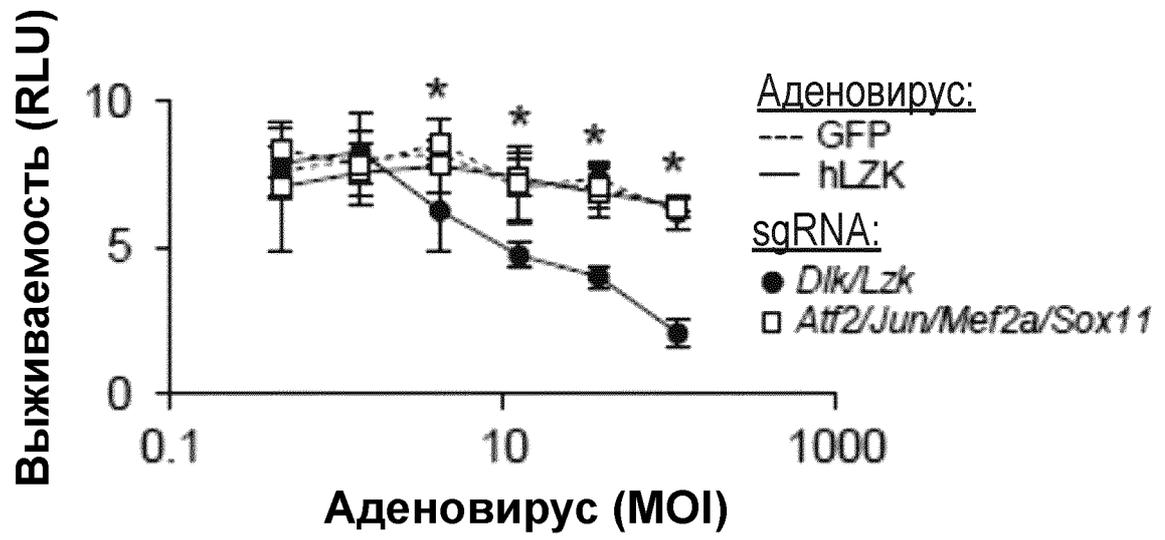
ФИГ.40G



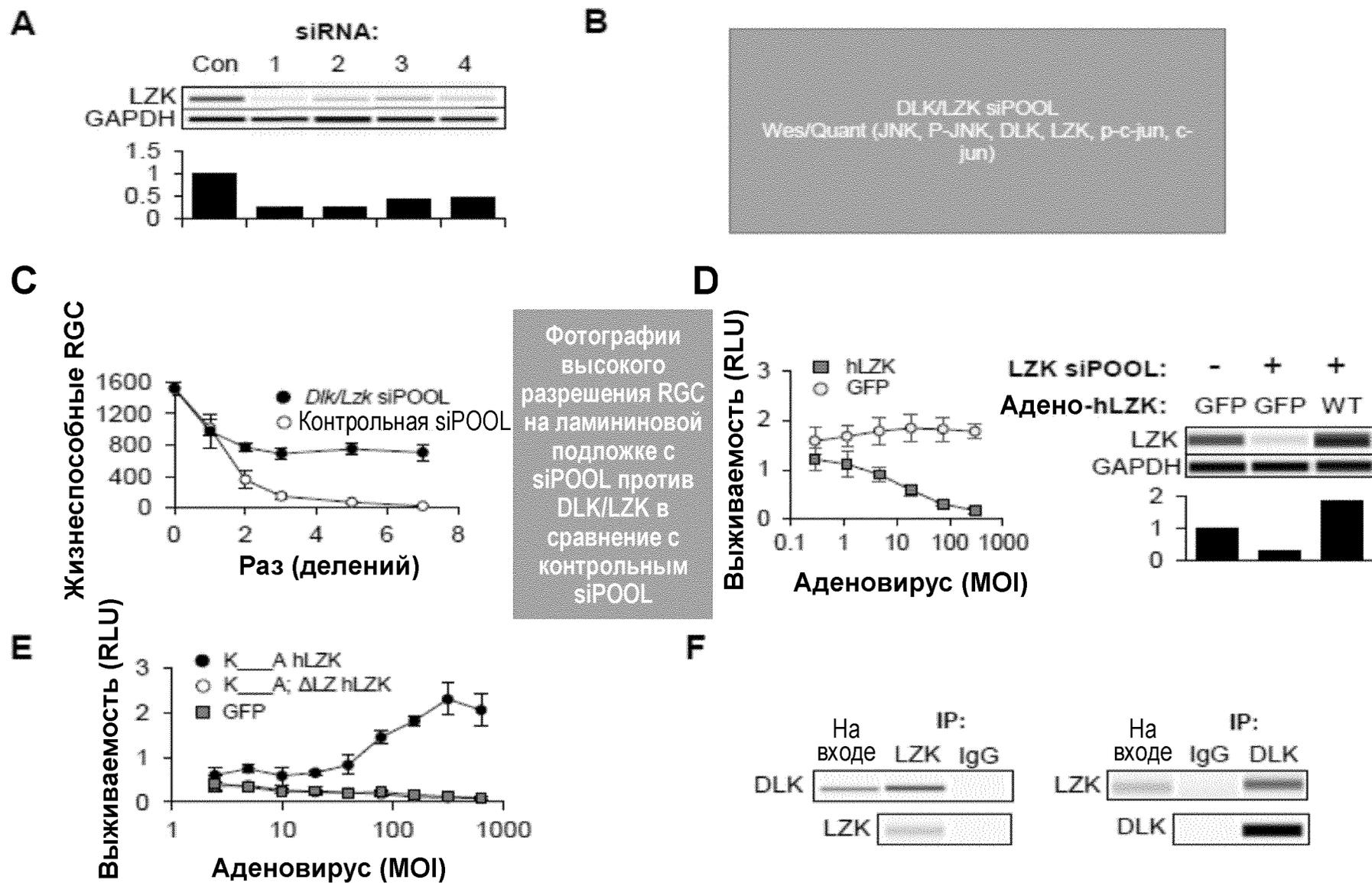
ФИГ.41



ФИГ.41Н

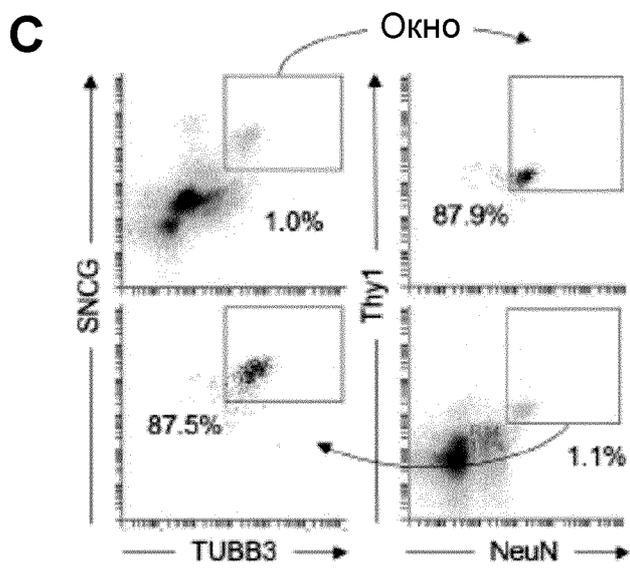
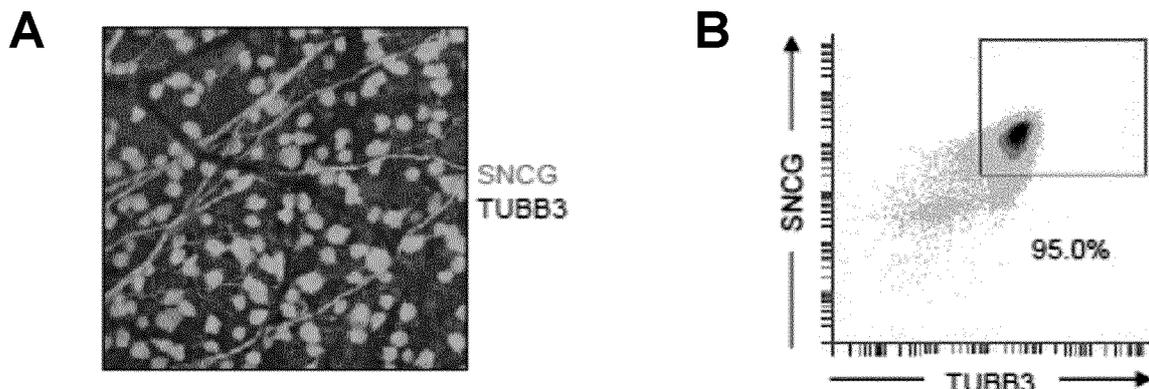


ФИГ.42



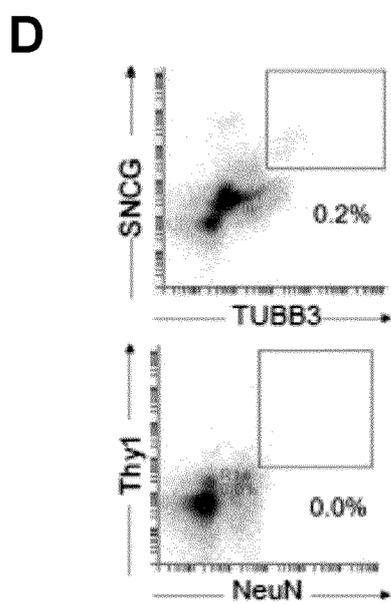
Фотографии  
высокого  
разрешения RGC  
на ламининовой  
подложке с  
siPOOL против  
DLK/LZK в  
сравнение с  
контрольным  
siPOOL

ФИГ.43



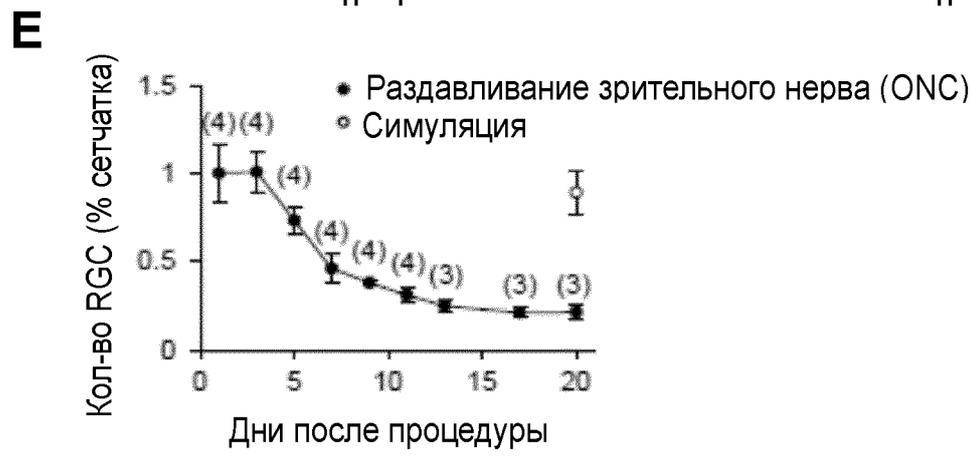
$0.9 \pm 0.1$	$86.5 \pm 4.9$
$85.9 \pm 2.0$	$0.9 \pm 0.2$

Клетки после установки  
дискриминационного окна (%)  
n = 4



$0.2 \pm 0.0$
$0.0 \pm 0.0$

Клетки после установки  
дискриминационного окна (%)  
n = 4



# ФИГ.44

## А Скорректированный на затравочную последовательность анализ:

Место по порядку	Ген	Оценка	Место по порядку	Ген	Оценка	Место по порядку	Ген	Оценка
1	<i>Bglap</i>	2.63	17	<i>Gm4836</i>	1.67	33	<i>Copsa7</i>	1.54
2	<i>Ap1g1</i>	2.35	18	<i>Olfr890</i>	1.66	34	<i>Zic2</i>	1.54
3	<i>Rbm15b</i>	2.10	19	<i>Ebi3</i>	1.64	35	<i>Tdrd7</i>	1.53
4	<i>Fcrlb</i>	2.09	20	<i>Olfr1241</i>	1.64	36	<i>Foxc1</i>	1.53
5	<i>Vstm5</i>	1.91	21	<i>Vezt</i>	1.64	37	<i>C19orf53</i>	1.50
6	<i>Wrnip1</i>	1.90	22	<b><i>Mefa2</i></b>	<b>1.63</b>	38	<i>Tmem86b</i>	1.49
7	<b><i>Atf2</i></b>	<b>1.89</b>	23	<i>Dpysl4</i>	1.58	39	<i>Txndc2</i>	1.48
8	<b><i>Bbc3</i></b>	<b>1.89</b>	24	<i>Ctdnep1</i>	1.58	40	<i>Cnnm1</i>	1.48
9	<i>Ccs</i>	1.87	25	<i>Nkx2-8</i>	1.58	41	<i>Serpinb6</i>	1.46
10	<i>Fgf7</i>	1.81	26	<i>Gdap10</i>	1.58	42	<i>Sorbs2</i>	1.44
11	<i>C15orf29</i>	1.76	27	<i>Pcdhb14</i>	1.57	43	<i>Krt8</i>	1.43
12	<i>Suv420h2</i>	1.73	28	<i>Coroa1</i>	1.57	44	<i>Pou4f1</i>	1.43
13	<i>Exd2</i>	1.73	29	<i>Trpc4ap</i>	1.56	45	<i>Ccdc166</i>	1.42
14	<b><i>Map2k7</i></b>	<b>1.72</b>	30	<i>Nqo2</i>	1.56	46	<i>Cb1c</i>	1.41
15	<b><i>Map2k4</i></b>	<b>1.71</b>	31	<i>Olfr458</i>	1.55	47	<i>Park7</i>	1.39
16	<i>Ubtf</i>	1.69	32	<i>Efcab5</i>	1.55	48	<i>Ccdc104</i>	1.39
						⋮		
						81	<b><i>Map3k12</i></b>	1.33

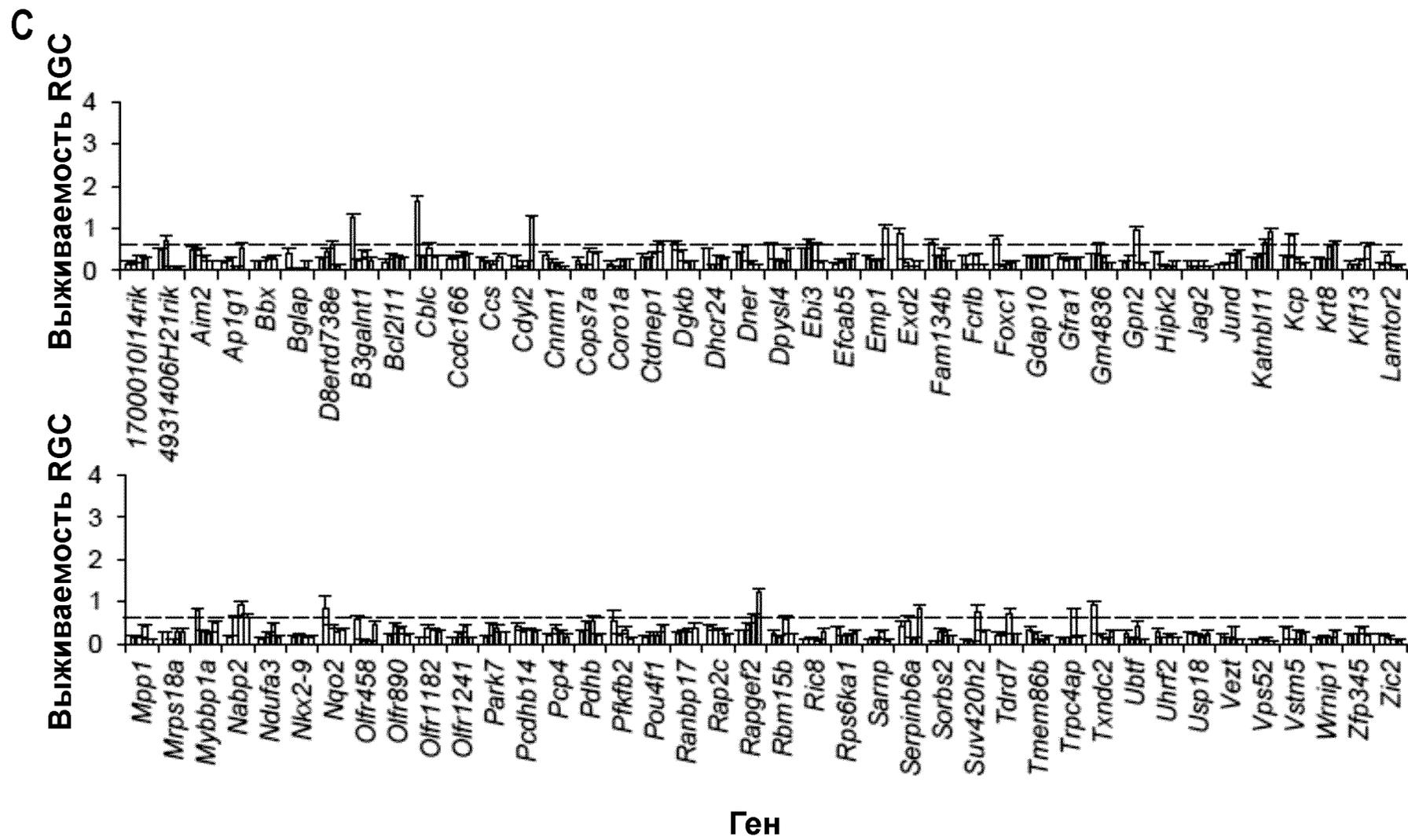
## В Анализ Хейстека:

Место по порядку	Ген	P-значение
1	<b><i>Bbc3</i></b>	<b>2.40E-57</b>
2	<i>Cpne8</i>	5.90E-51
3	<b><i>Atf2</i></b>	<b>3.04E-32</b>
8	<i>Setd8</i>	1.14E-23
9	<b><i>Map3k12</i></b>	<b>1.35E-23</b>
14	<i>Spry3</i>	5.37E-20
15	<i>Vtcn1</i>	6.40E-20
16	<i>Eif2d</i>	6.21E-18
17	<i>Sh3bp1</i>	1.84E-17
18	<i>Mpp4</i>	4.05E-17
19	<i>Hoxb13</i>	8.63E-17
21	<i>Cript</i>	3.78E-16
22	<i>Fam24a</i>	4.64E-16
23	<b><i>Map2k4</i></b>	<b>8.45E-16</b>

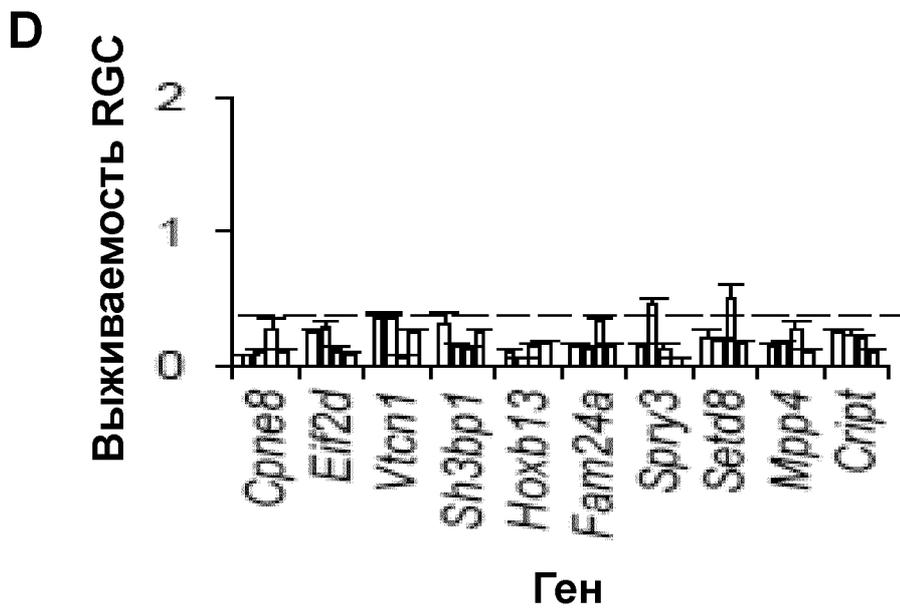
С

4

ФИГ.44 (продолжение)

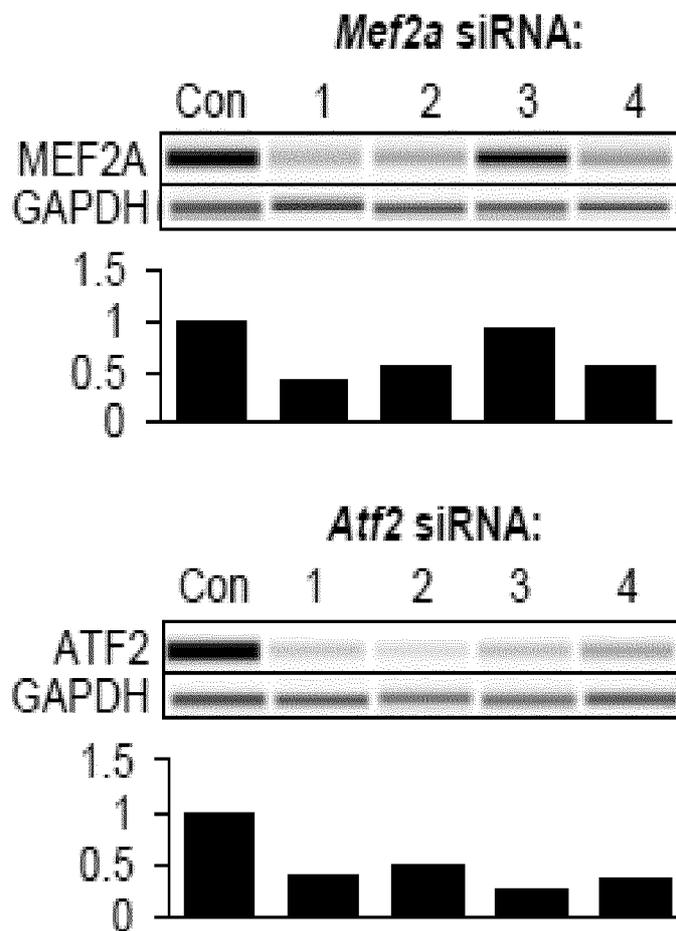


ФИГ.44 (продолжение)



ФИГ.45

A



siRNA против PUMA Qiagen  
в сравнение с контролем,  
исследование мРНК для PUMA  
в сравнение с мРНК для GAPDH

## ФИГ.45 (продолжение)

**B**

Либо исправьте количественную оценку в соответствии со стандартом Западной Европы для siPOOL против Mef2, либо повторите



siPOOL против PUMA Qiagen в сравнение с контролем, исследование мРНК для PUMA в сравнение с мРНК для GAPDH

**C**

Эксперименты с вирусами, экспрессирующими PUMA

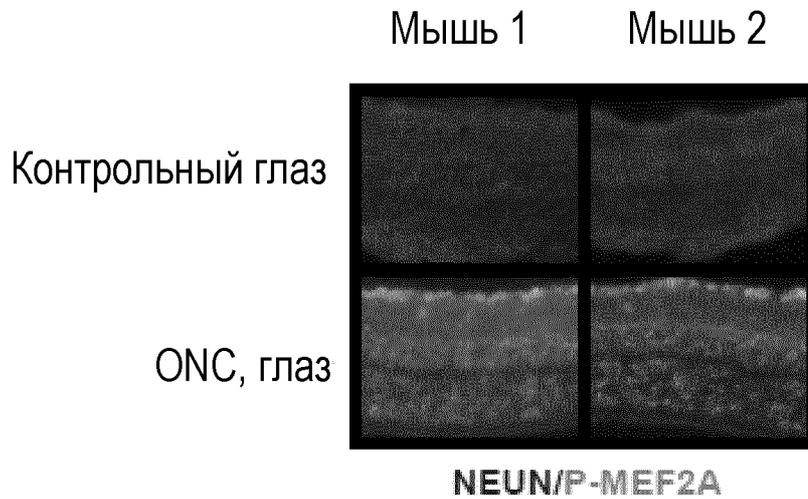
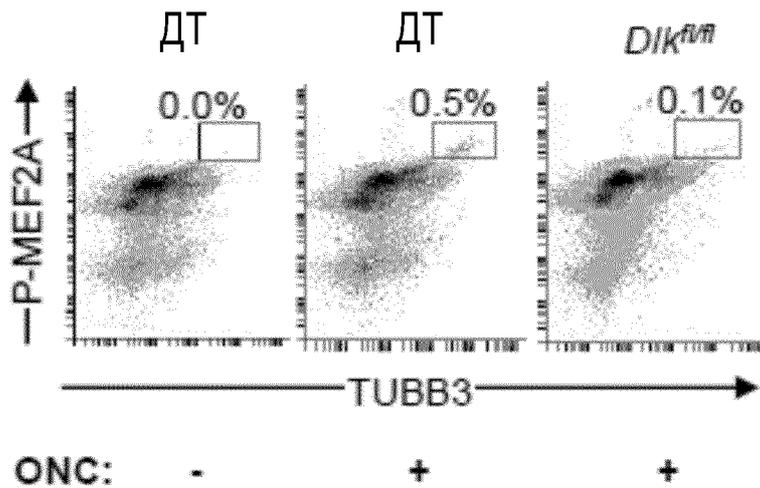
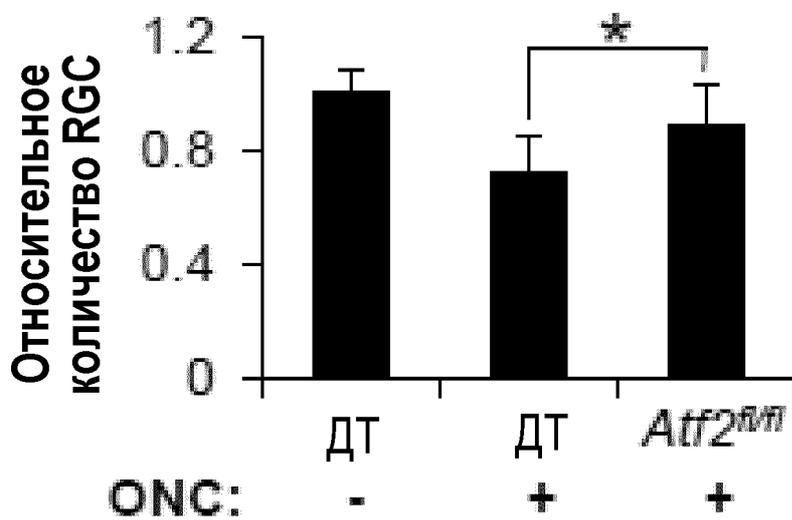
**D**

Эксперимент с использованием кПЦР на RGC WT, 0 в сравнение с 24, обработанных носителем, колхицином, 2 мкМ VX, siPOOL против DLK/LZK

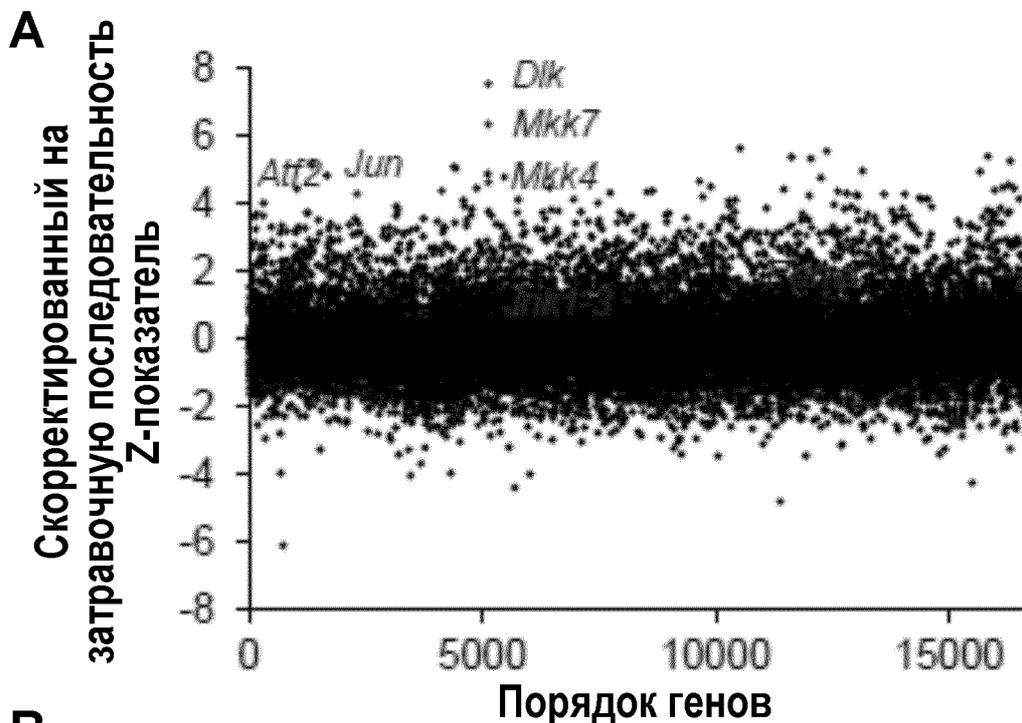
**E**

Данные для Foxo3a

ФИГ.45 (продолжение)

**F****G****И**

ФИГ.46



**В** Скорректированный на затравочную последовательность анализ:

Место по порядку	Ген	Оценка	Место по порядку	Ген	Оценка	Место по порядку	Ген	Оценка
1	Map3k12	7.56	17	Iqcj	4.80	33	4833420G17Rik	4.33
2	Map2k7	6.37	18	Gpn1	4.69	34	Stac2	4.33
3	Gpank1	5.66	19	Map2k4	4.64	35	C2cd4c	4.32
4	Lacc1	5.58	20	Hfm1	4.58	36	Tmem150c	4.31
5	Zfp653	5.43	21	Med25	4.52	37	Jun	4.30
6	Pp2d1	5.41	22	Ascl3	4.50	38	Dbx2	4.27
7	Vmn1r75	5.37	23	Dna2	4.50	39	Ubxn7	4.27
8	Zfp866	5.29	24	Zfp36	4.48	40	Vmn1r18	4.26
9	Evi5	5.16	25	Caps2	4.48	41	Cep72	4.23
10	Tcte1	5.12	26	Cyp4b1	4.47	42	Ugt2b35	4.19
11	Zfand3	5.07	27	Ccdc122	4.45	43	BC061212	4.17
12	Cplx4	5.00	28	B830004H01Rik	4.42	44	Map7d1	4.17
13	Tarsl2	4.97	29	Snrpb	4.41	45	Ppih	4.16
14	Rfwd2	4.91	30	Krtcap3	4.40	46	Fam71e2	4.15
15	Ghrh	4.86	31	Trim50	4.38	47	Bcl9l	4.14
16	Cabp2	4.82	32	Wdfy1	4.37	48	Lurap1l	4.13

## ФИГ.46 (продолжение)

**С**

Подтверждение, что все олигонуклеотиды Qiagen находятся в соответствии с Genome 2.0. включите положительный и отрицательный контроли, проверьте с и без siPOOL против LZK, используйте колхицин

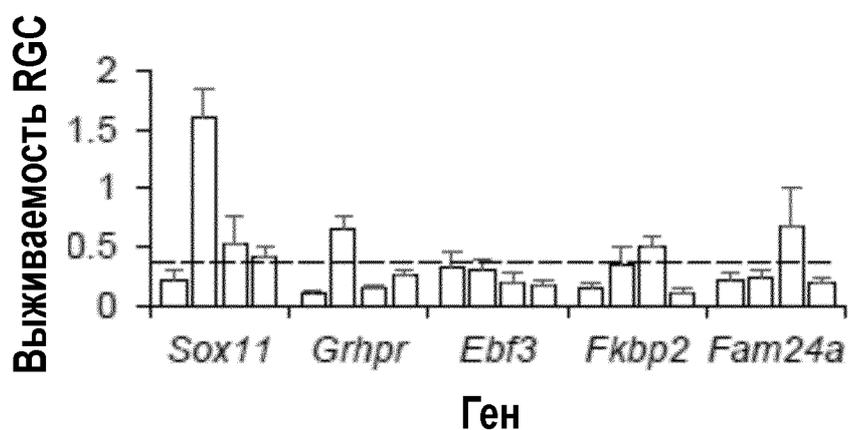
## ФИГ.46 (продолжение)

D

## Анализ Хейстека

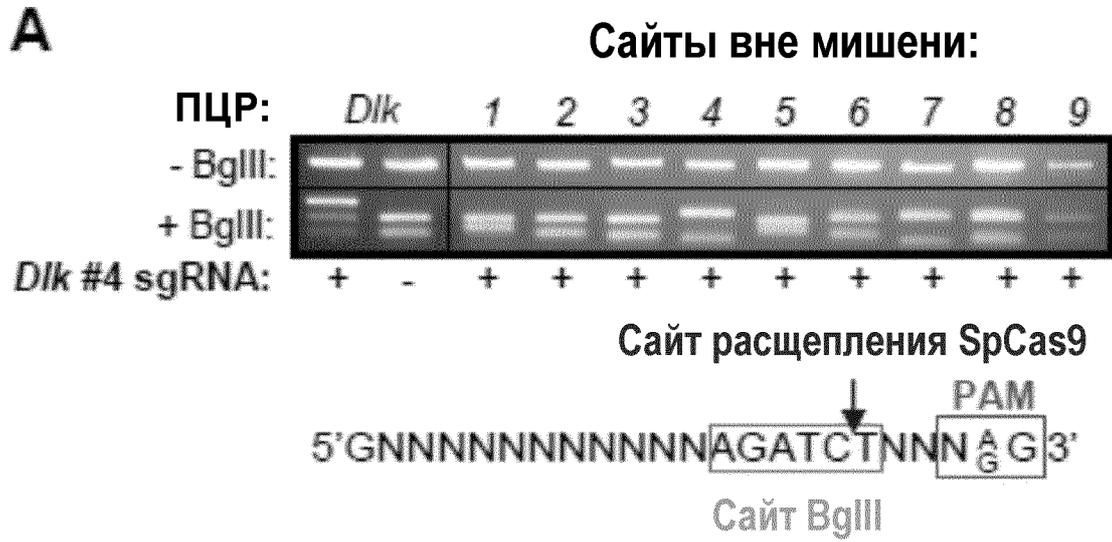
Место по порядку	Ген	P-значение
1	<i>Sox11</i>	9.44E-29
2	<i>Map2k4</i>	1.26E-26
3	<i>Bbc3</i>	5.91E-25
5	<i>Fkbp2</i>	2.45E-15
7	<i>Grhpr</i>	1.02E-12
8	<i>Fam24a</i>	1.53E-12
10	<i>Ebf3</i>	9.54E-12

E



*Sox11*-специфическая кПЦР (убедившись, что нет контроля ОТ) с использованием различных олигонуклеотидов Qiagen

ФИГ.47

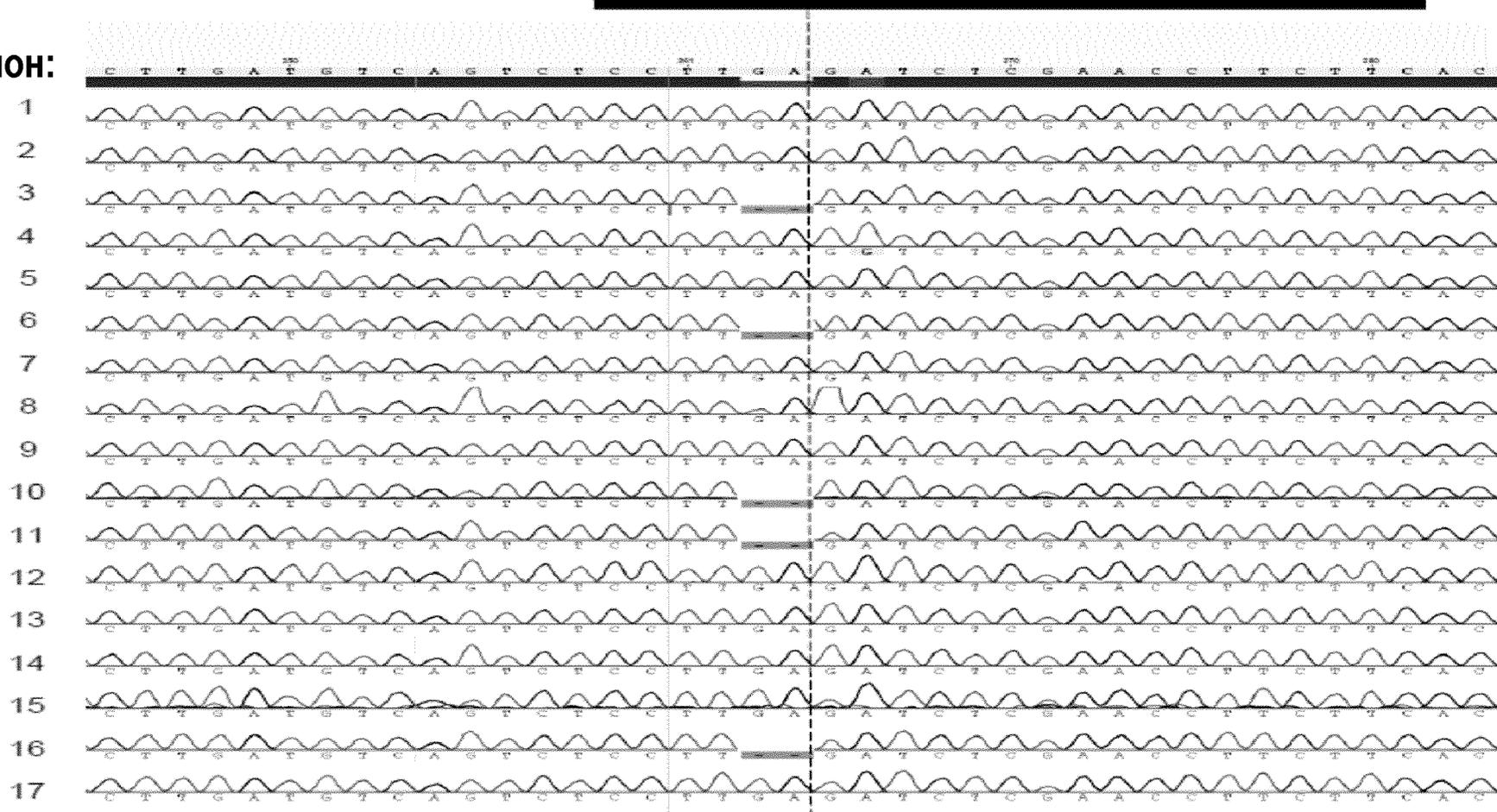


ФИГ.47 (продолжение)

**В**

*Dlk #4 sgRNA*

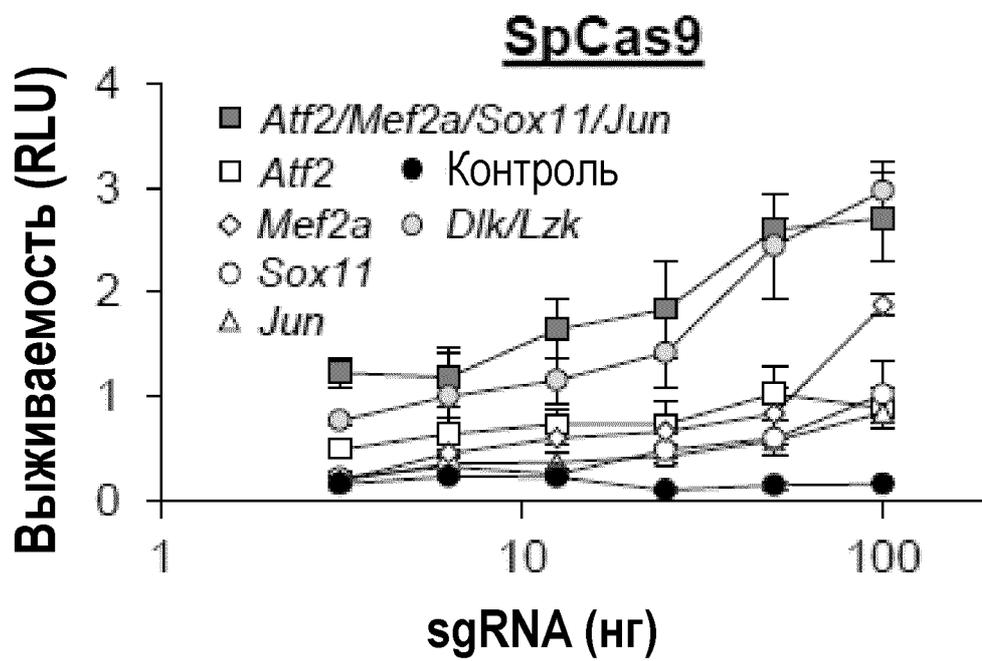
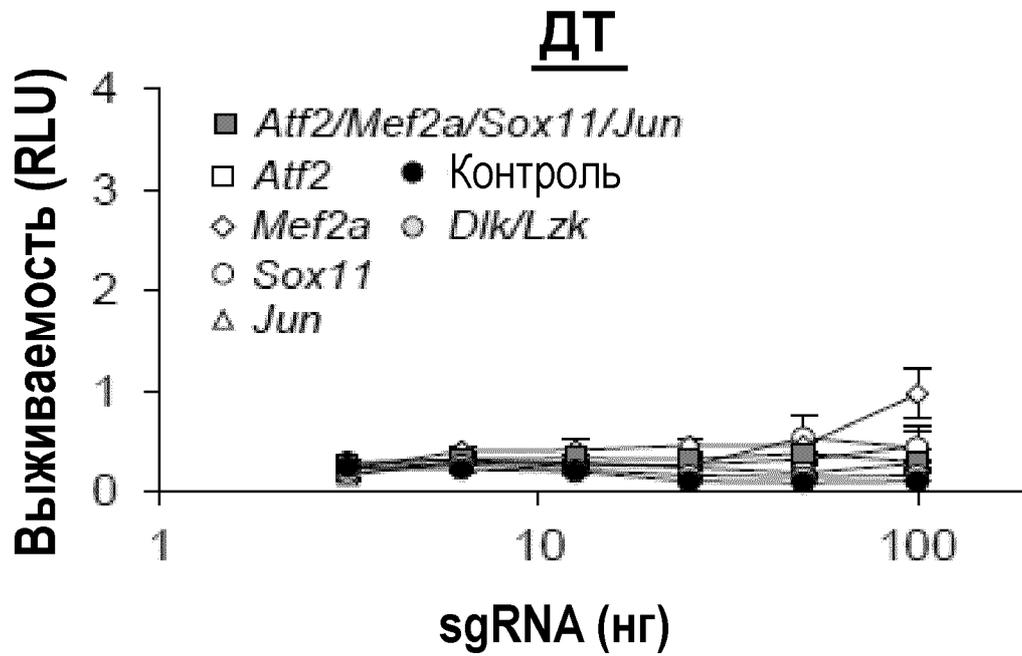
Субклон:



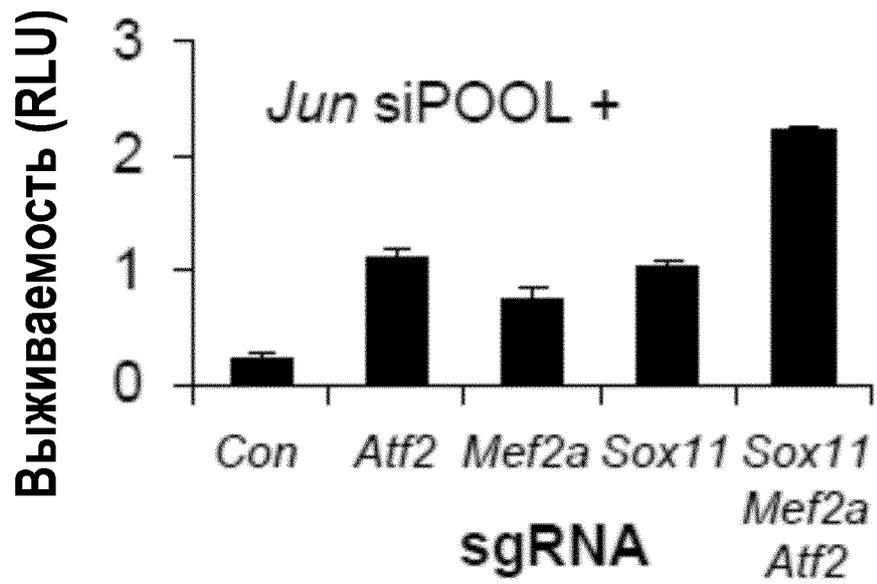
Сайт расщепления SpCas9

ФИГ.48

А



ФИГ.48 (продолжение)

**В**

## ФИГ.49

tracrRNA	mm190	mm204	mm094	mm079	mm936	mm926
Контроль	1 (E4)	2 (E4)	3 (E5)	4 (E5)	5 (E7)	6 (E7)

100 нг

mm375	mm775	mm878	mm942
1 (E2)	2 (E3)	3 (E4)	4 (E5)

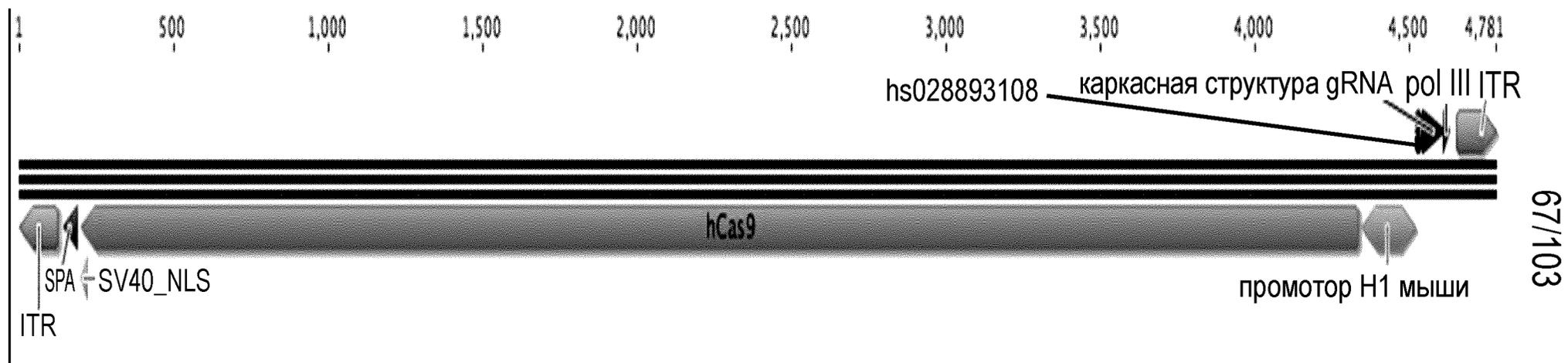
197 для dlk

946 для lzk

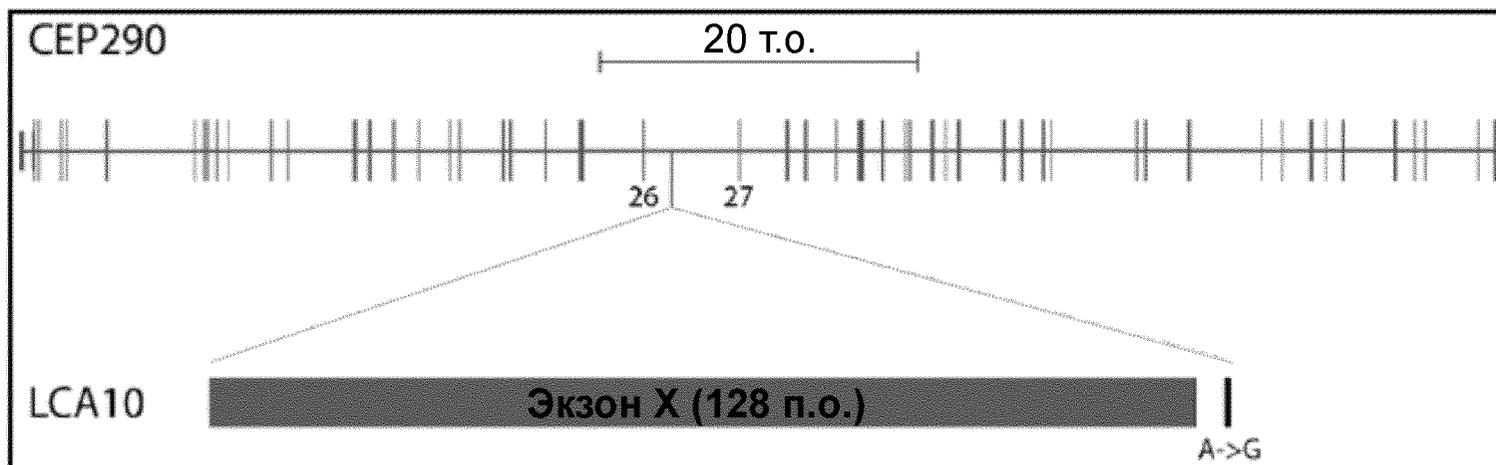
197/079/926 для пула против dlk

946/878/775 для пула против lzk

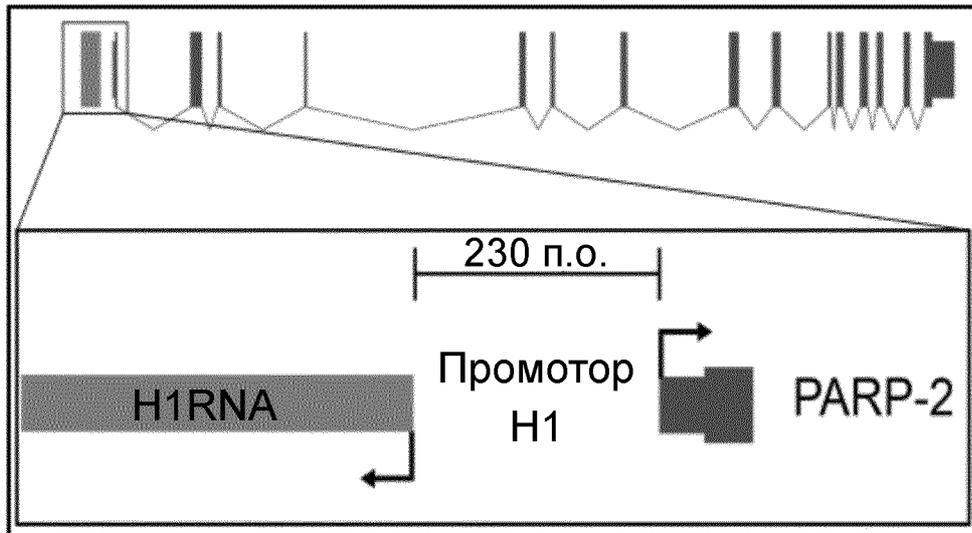
ФИГ.50



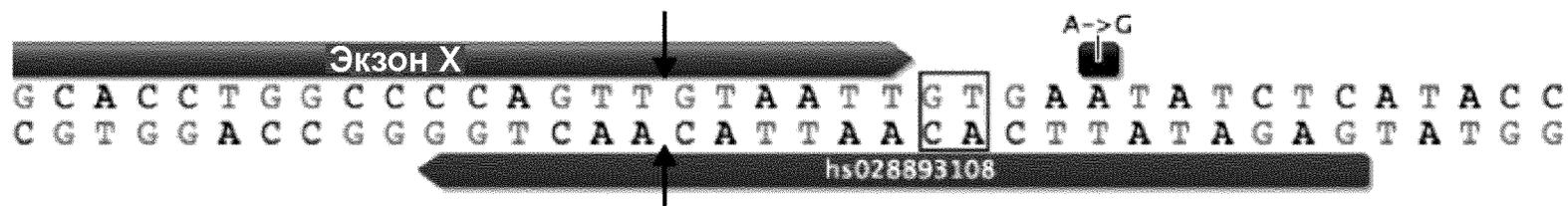
ФИГ.51



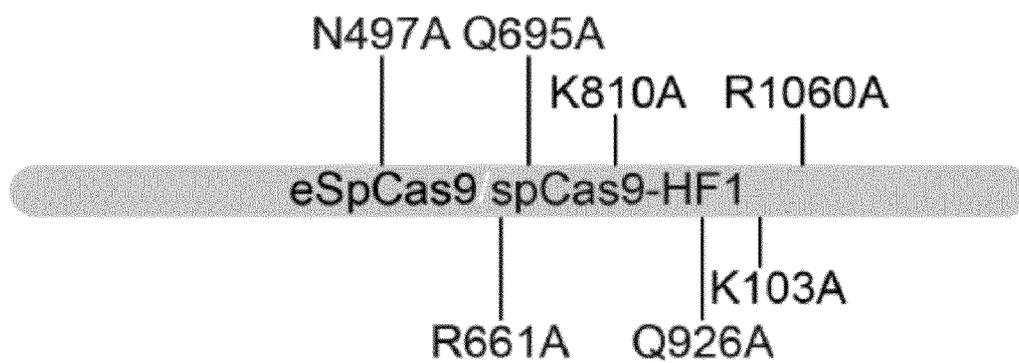
ФИГ.52



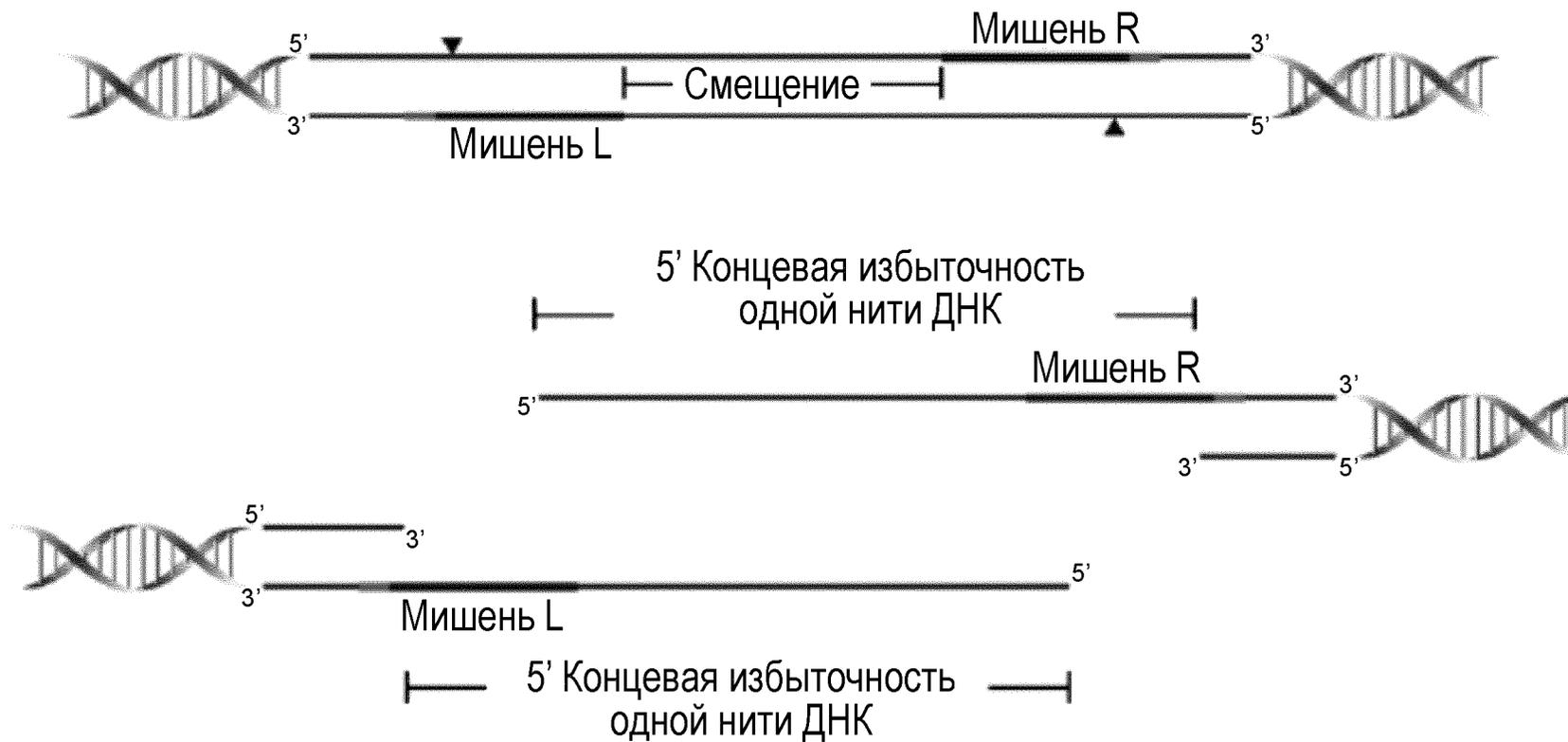
ФИГ.53



ФИГ.54

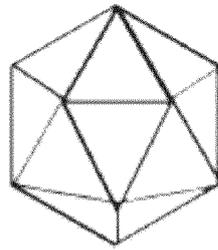


ФИГ.55



ФИГ.56

A.



AAV

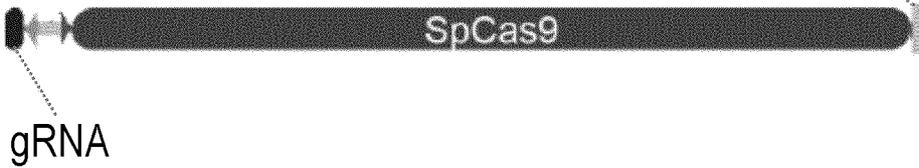
Емкость AAV

4800 п.о.

B.

Двунаправленный промотор H1

Терминатор



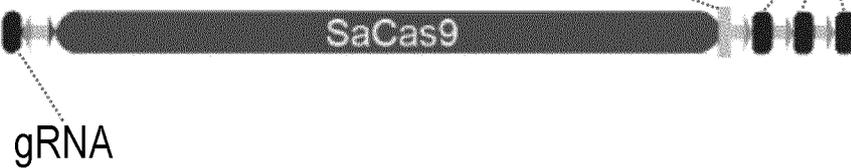
4455 п.о.

C.

Двунаправленный промотор H1

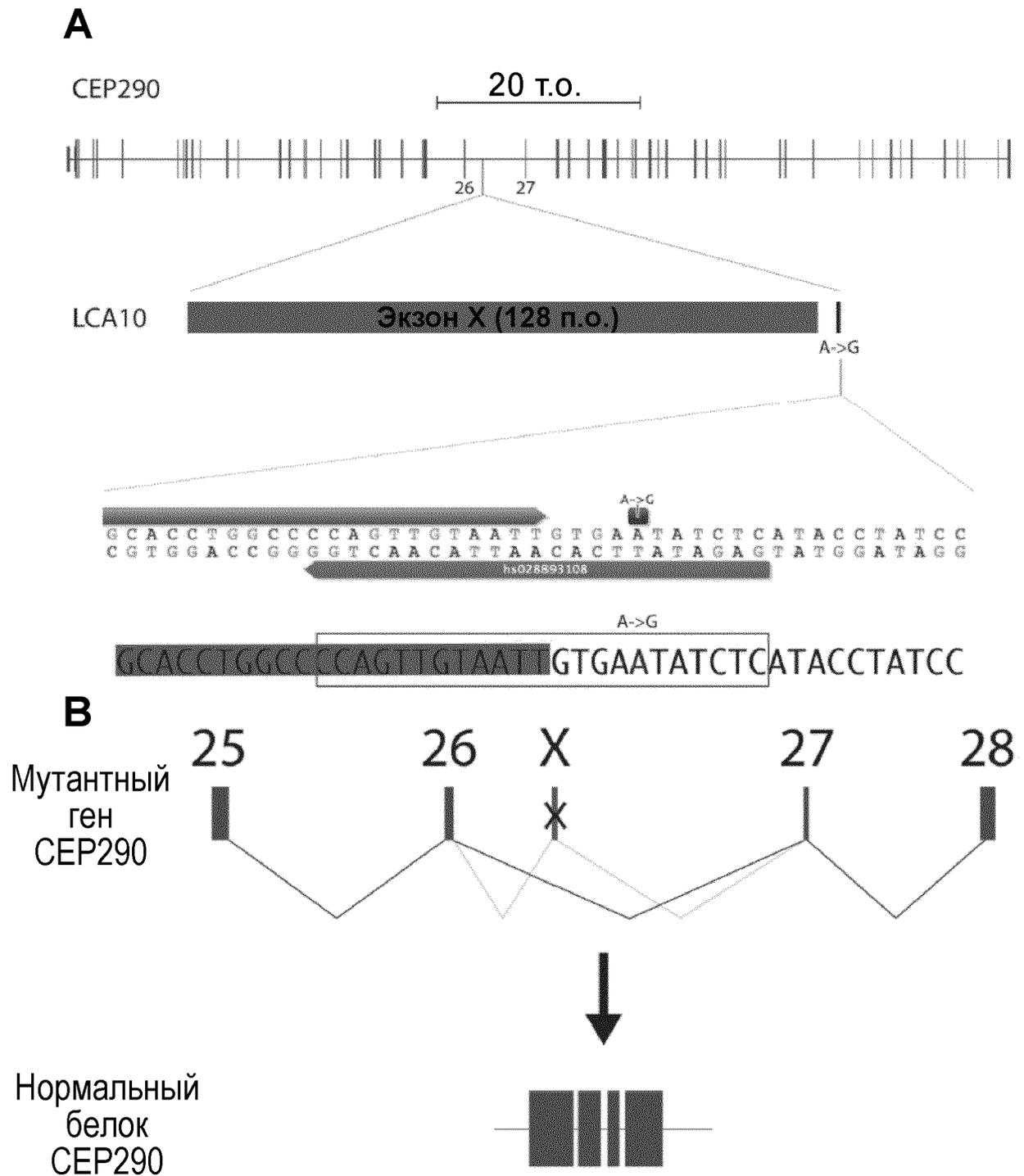
Терминатор

gRNA

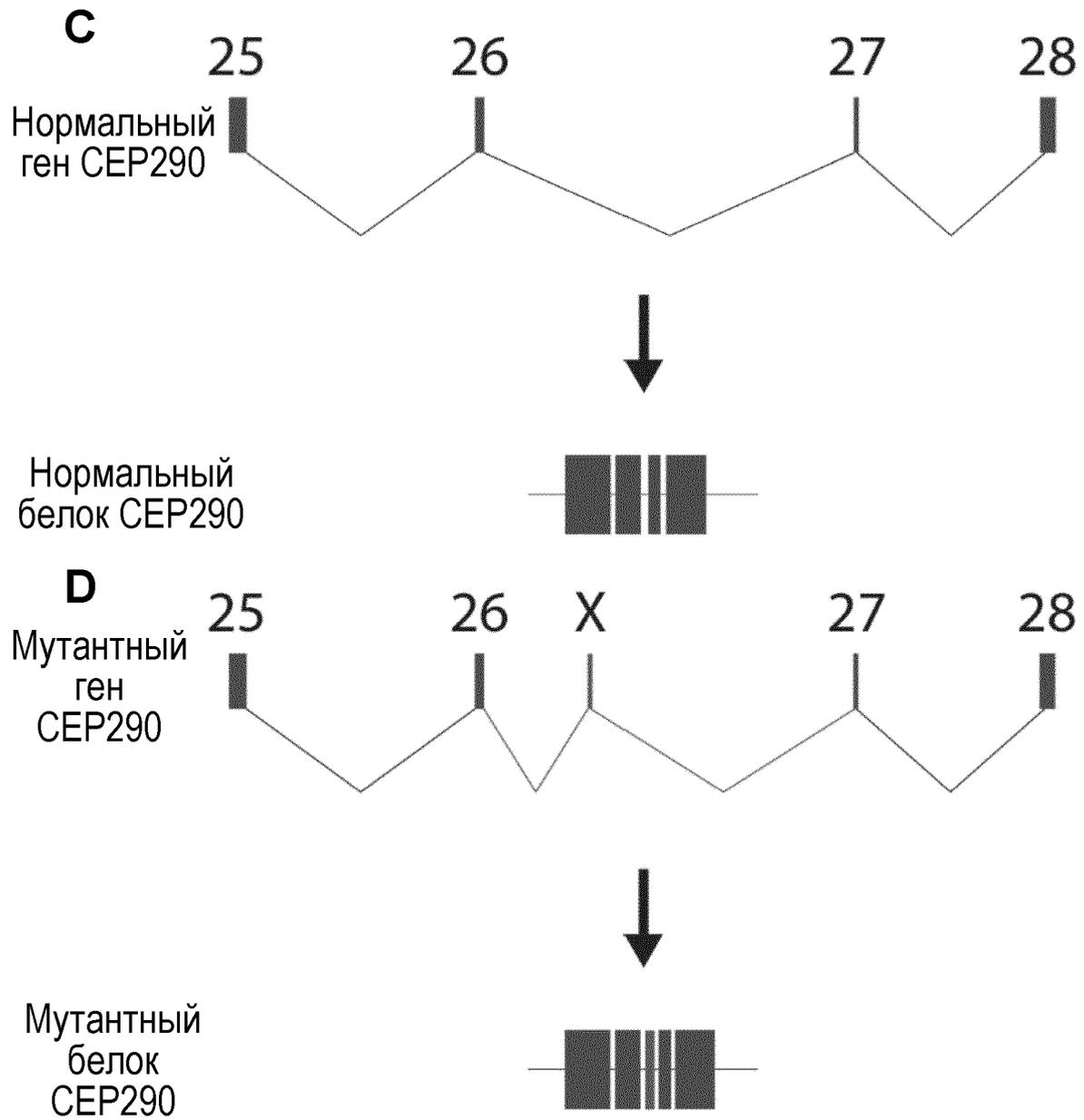


4225 п.о.

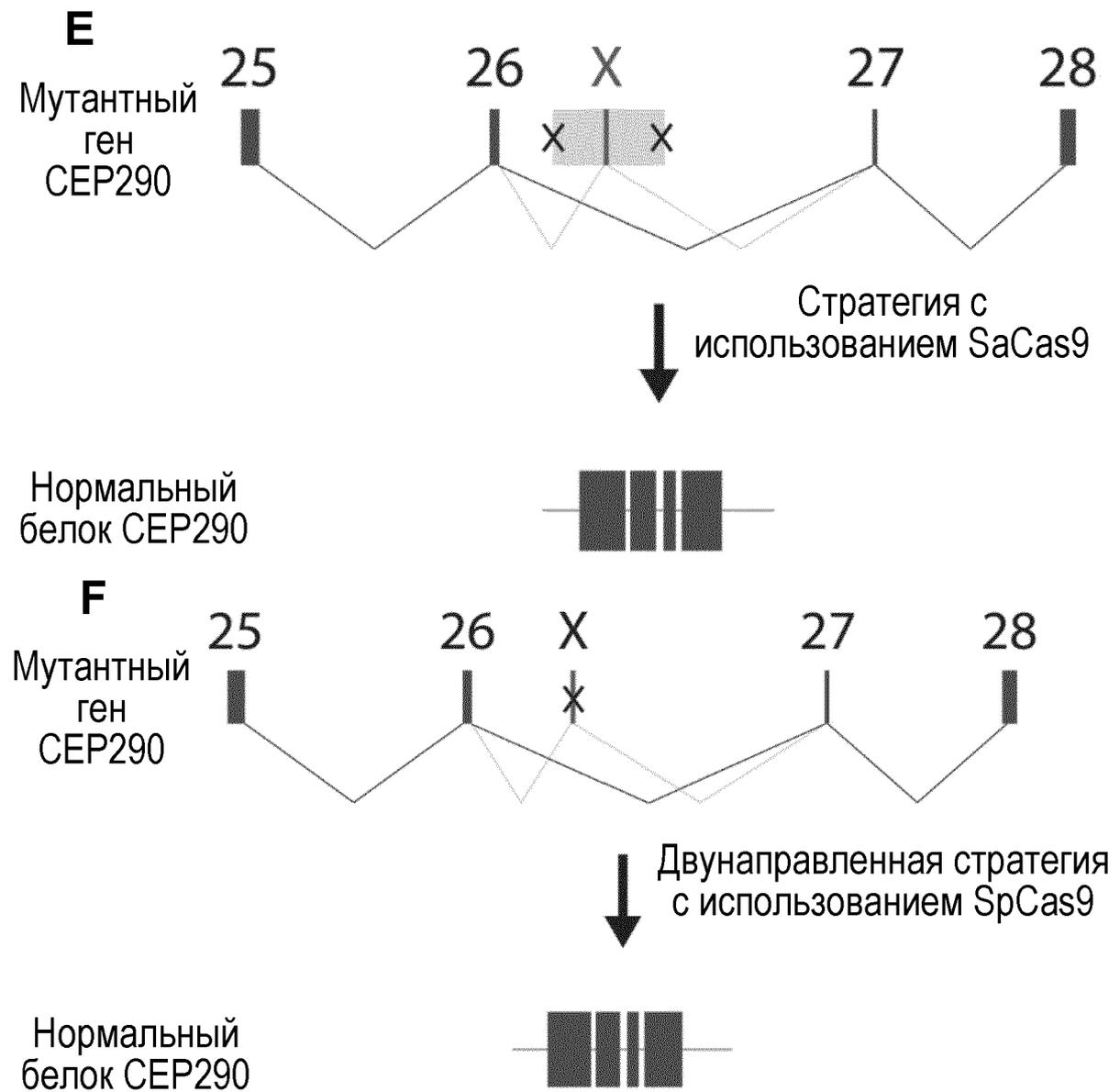
ФИГ.57



ФИГ.57 (продолжение)

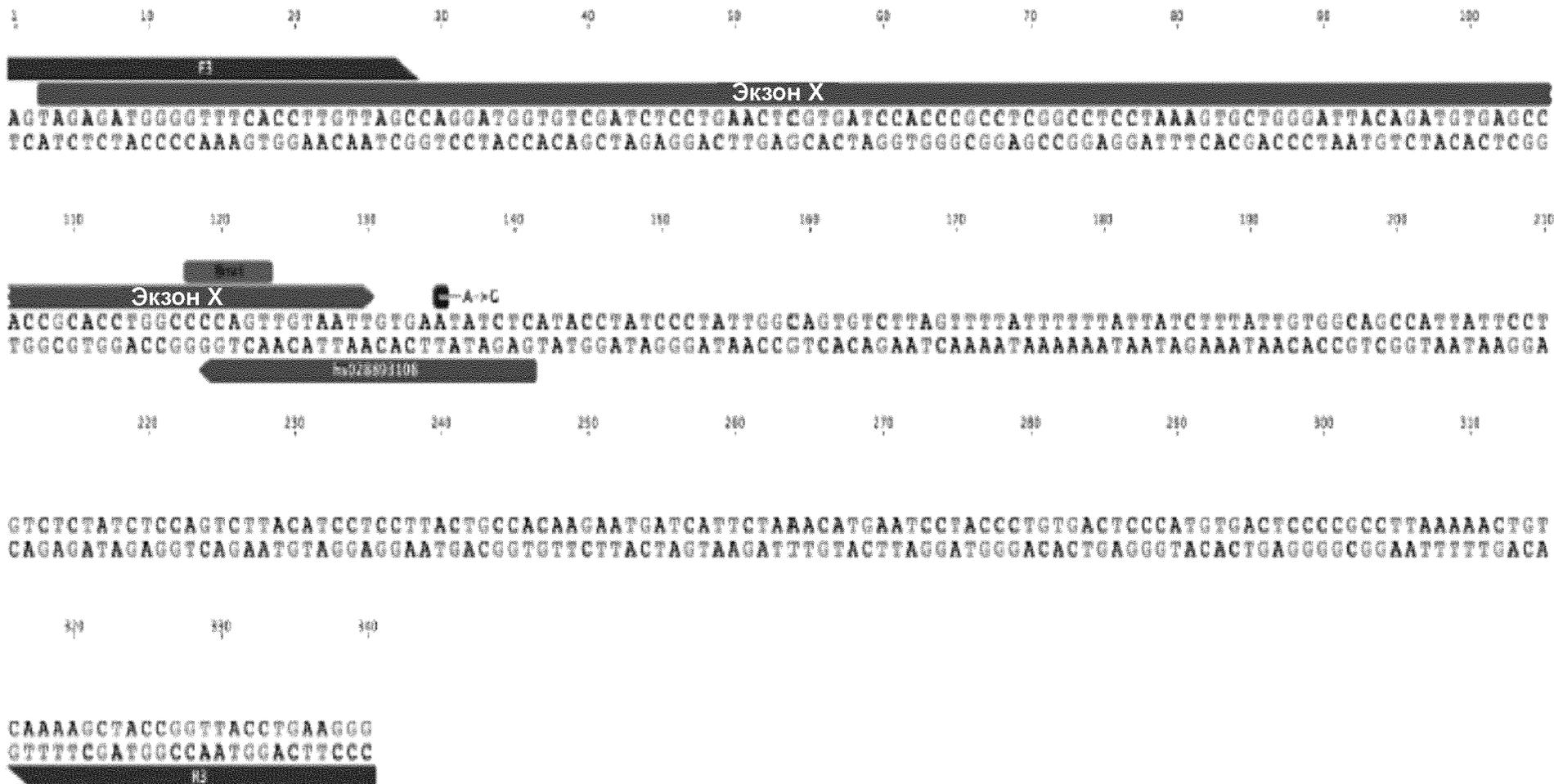


ФИГ.57 (продолжение)



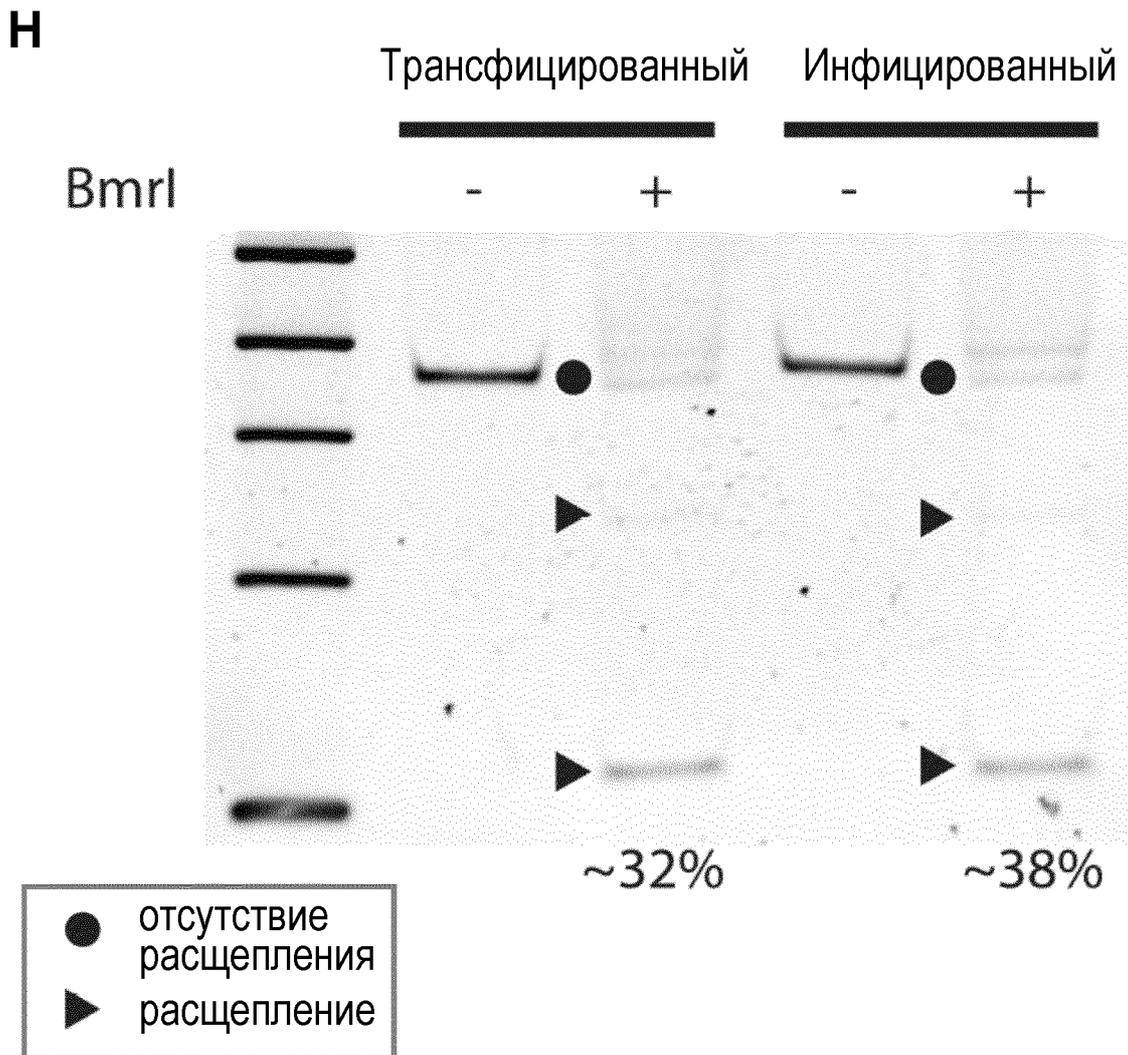
# ФИГ.57 (продолжение)

## G

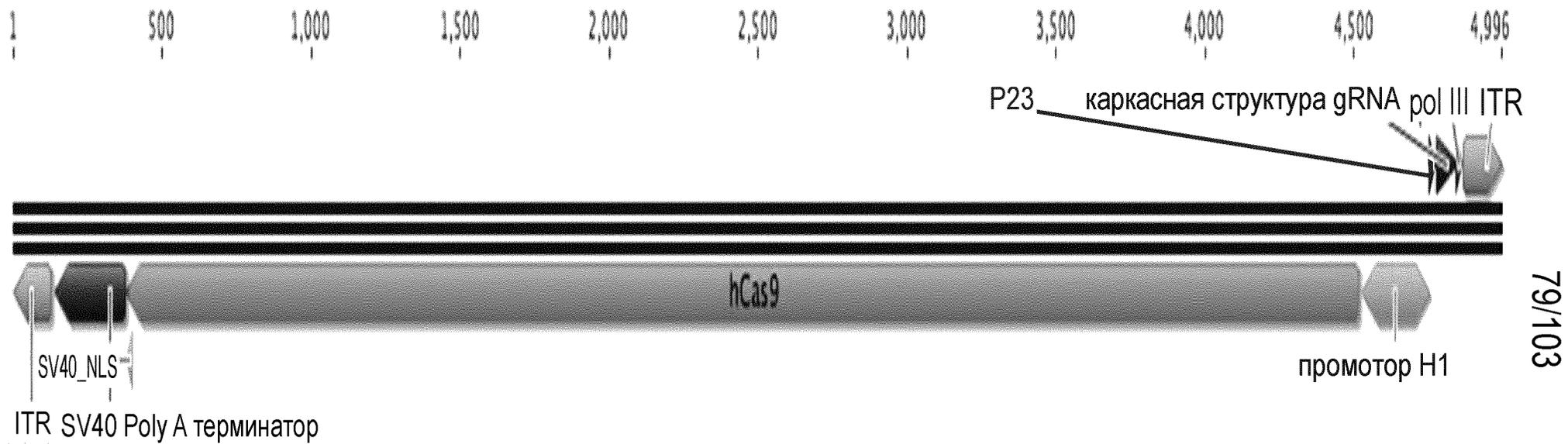


77/103

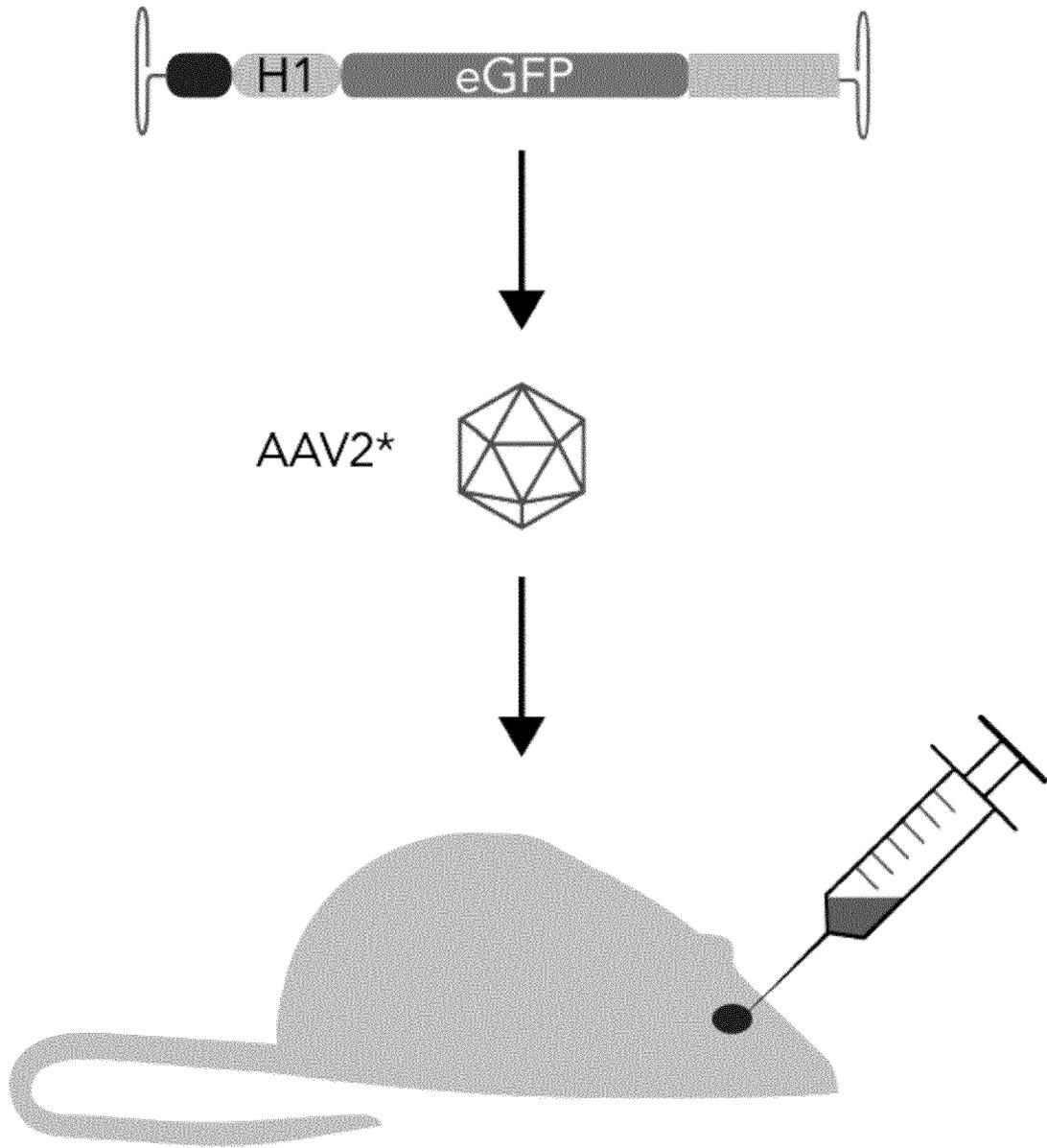
ФИГ.57 (продолжение)



ФИГ.58



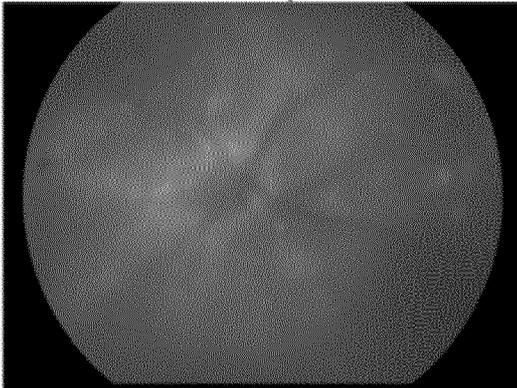
ФИГ.59А



ФИГ.59В

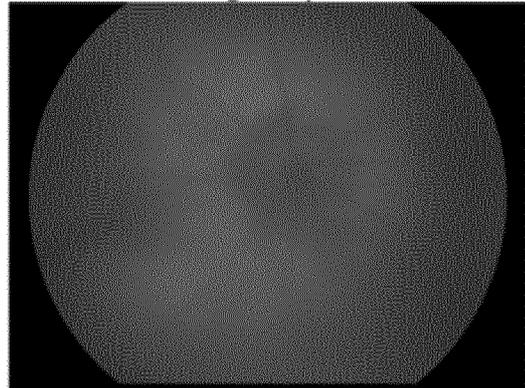
In vivo визуализация (через 14 дней)

Левый глаз

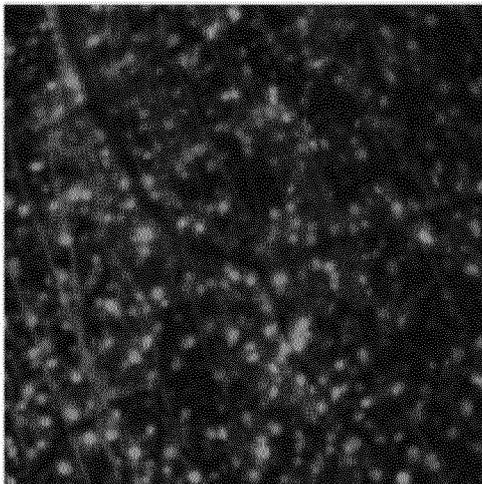


AAV2\*::H1:GFP

Правый глаз

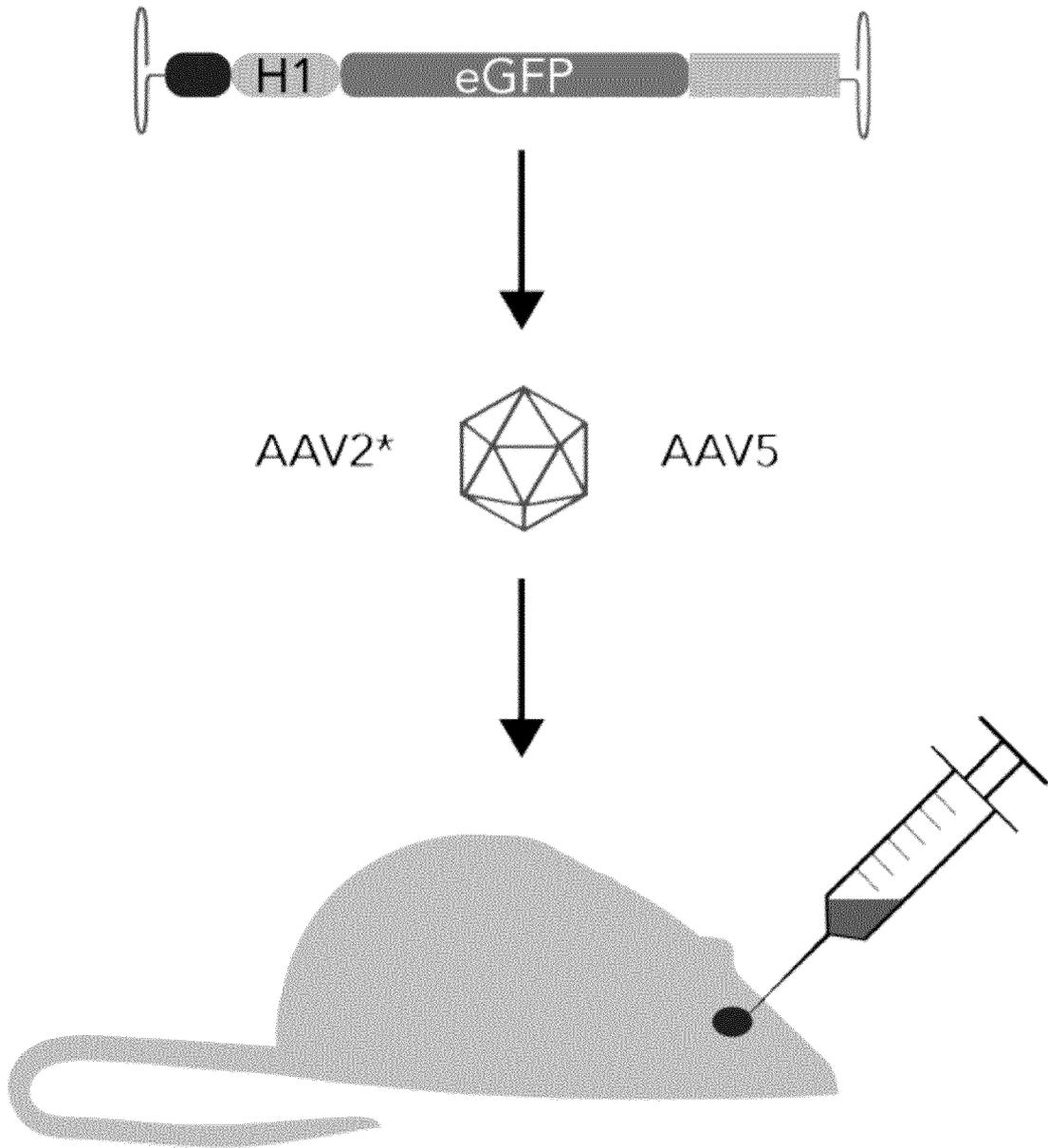


AAV::контроль

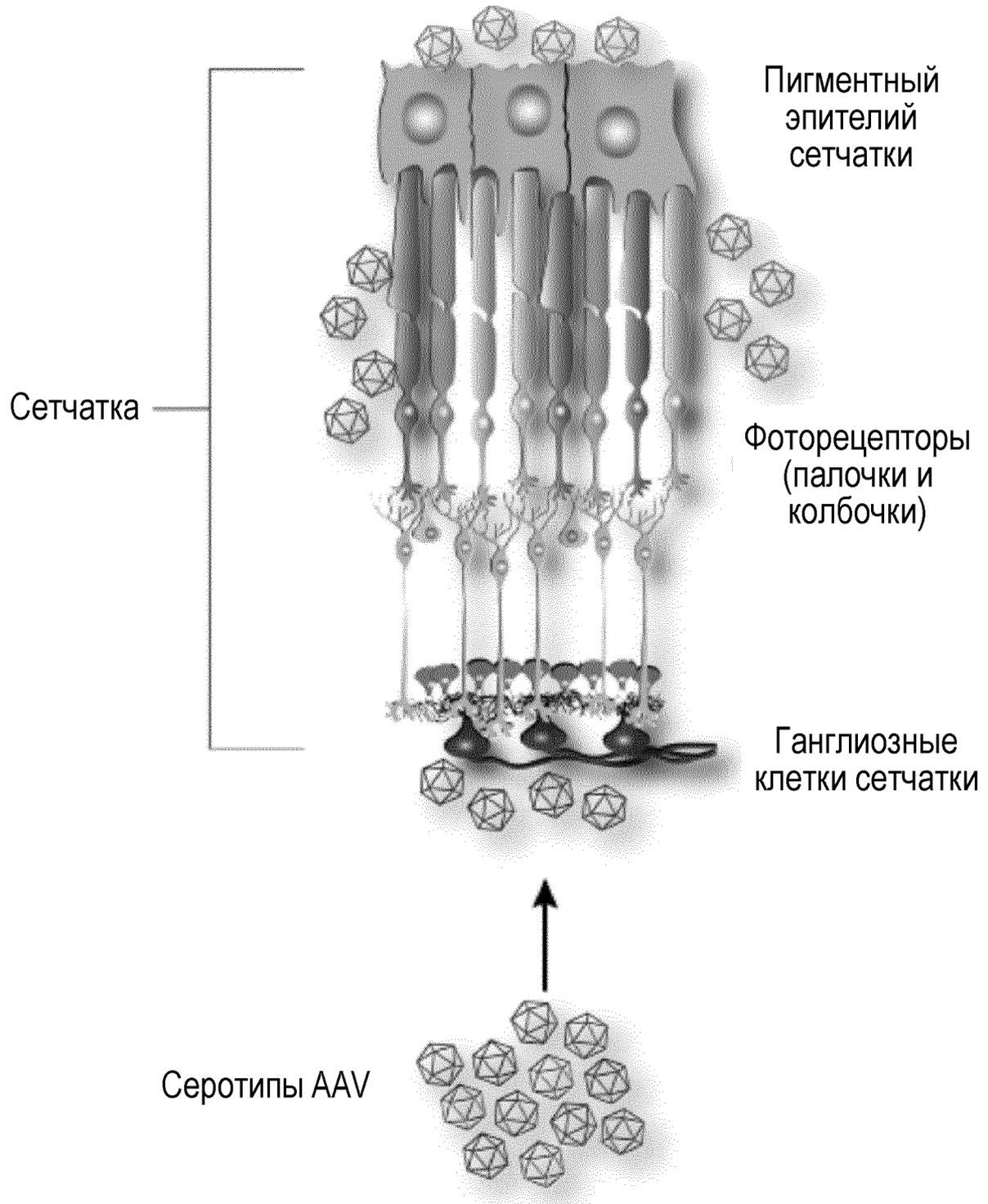


Плоский срез сетчатки

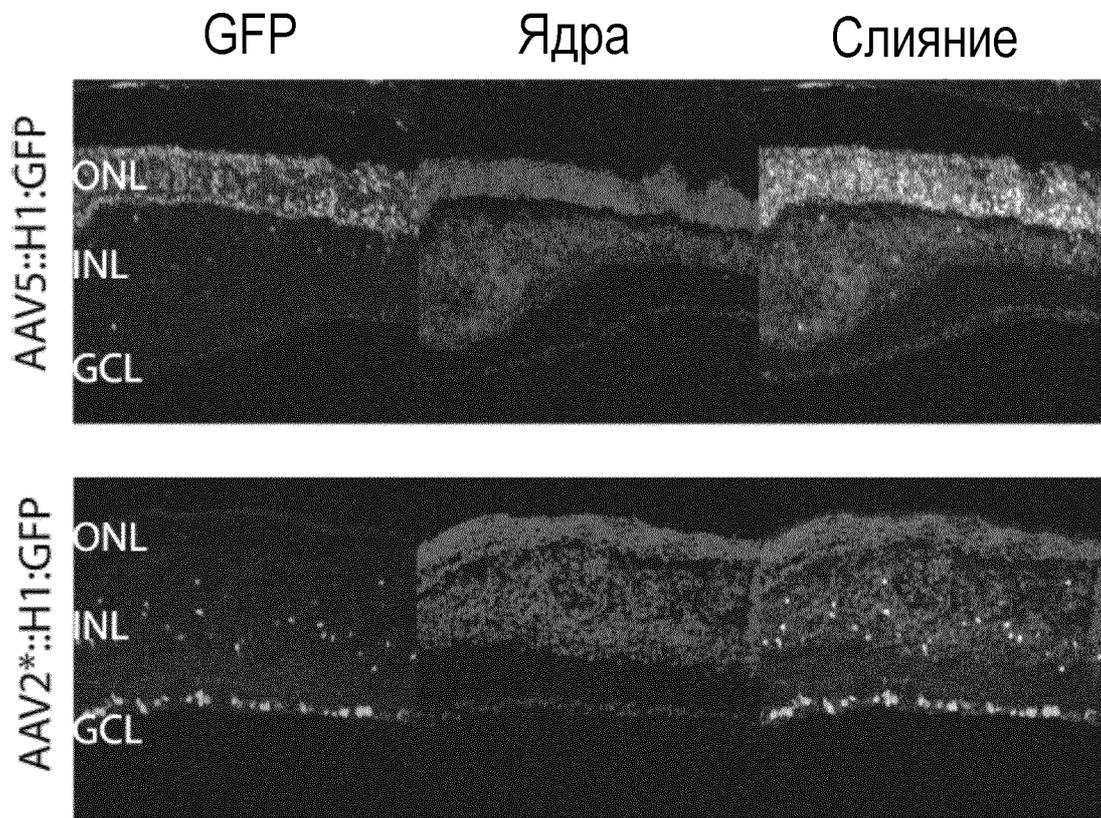
ФИГ.59С



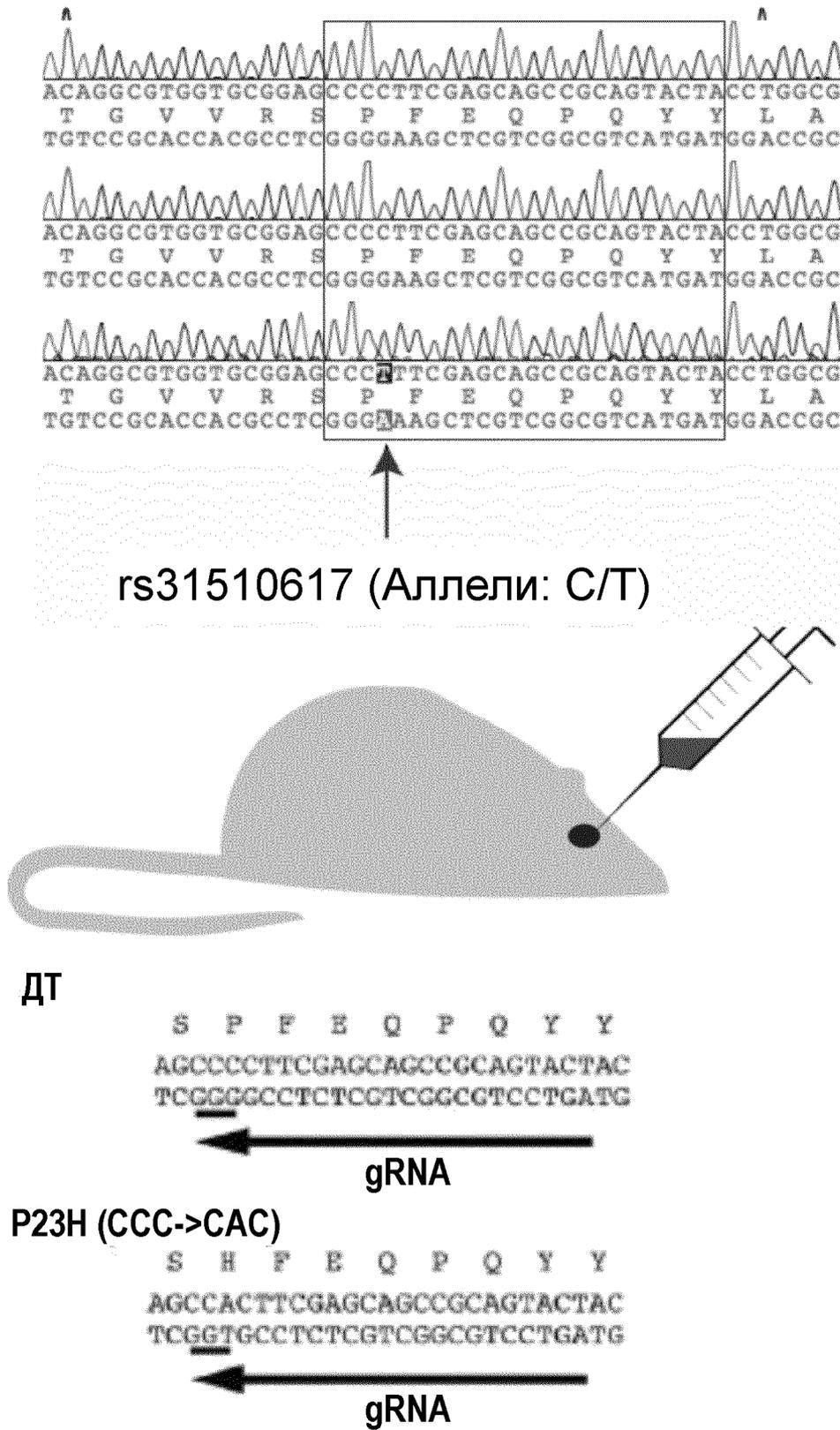
ФИГ.59D



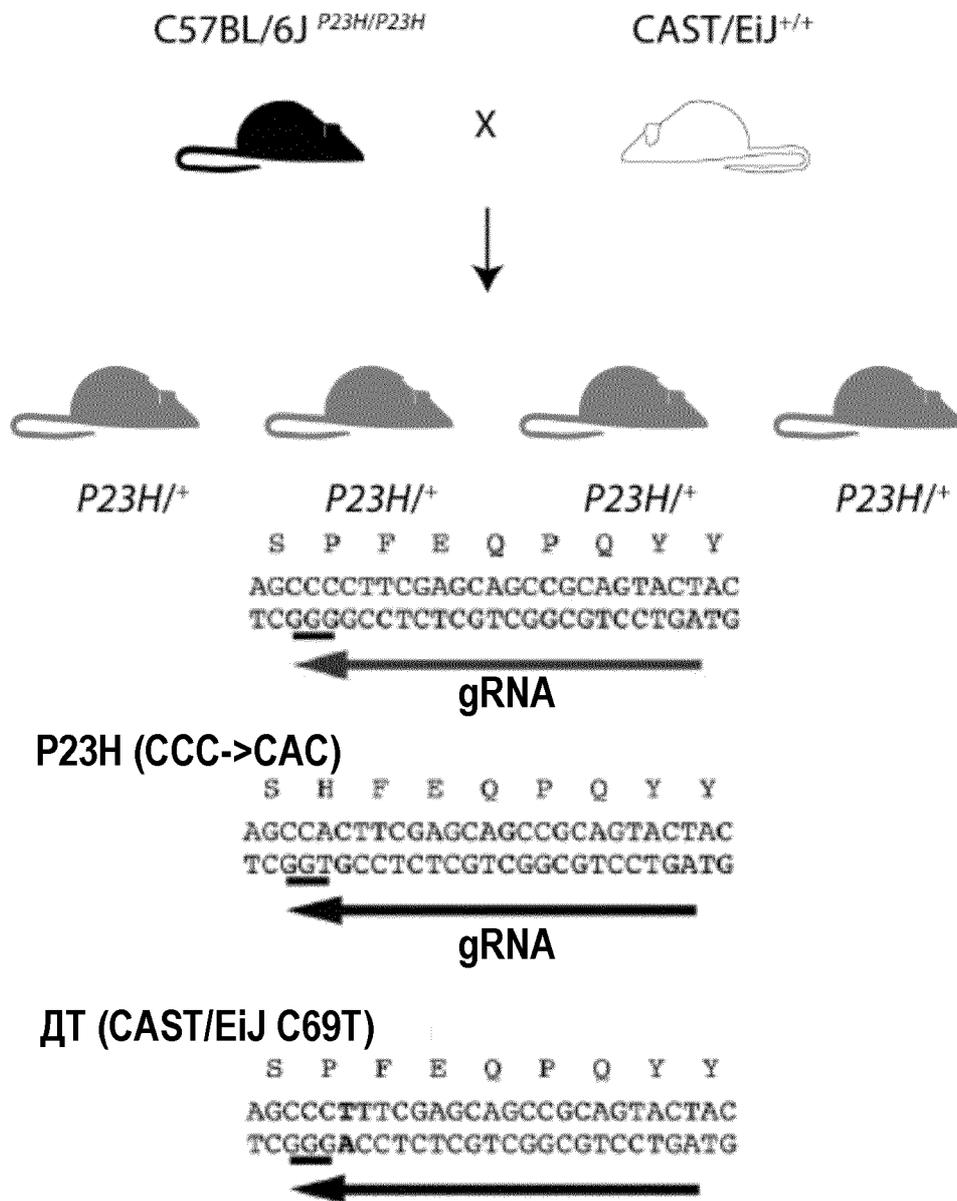
ФИГ.59Е



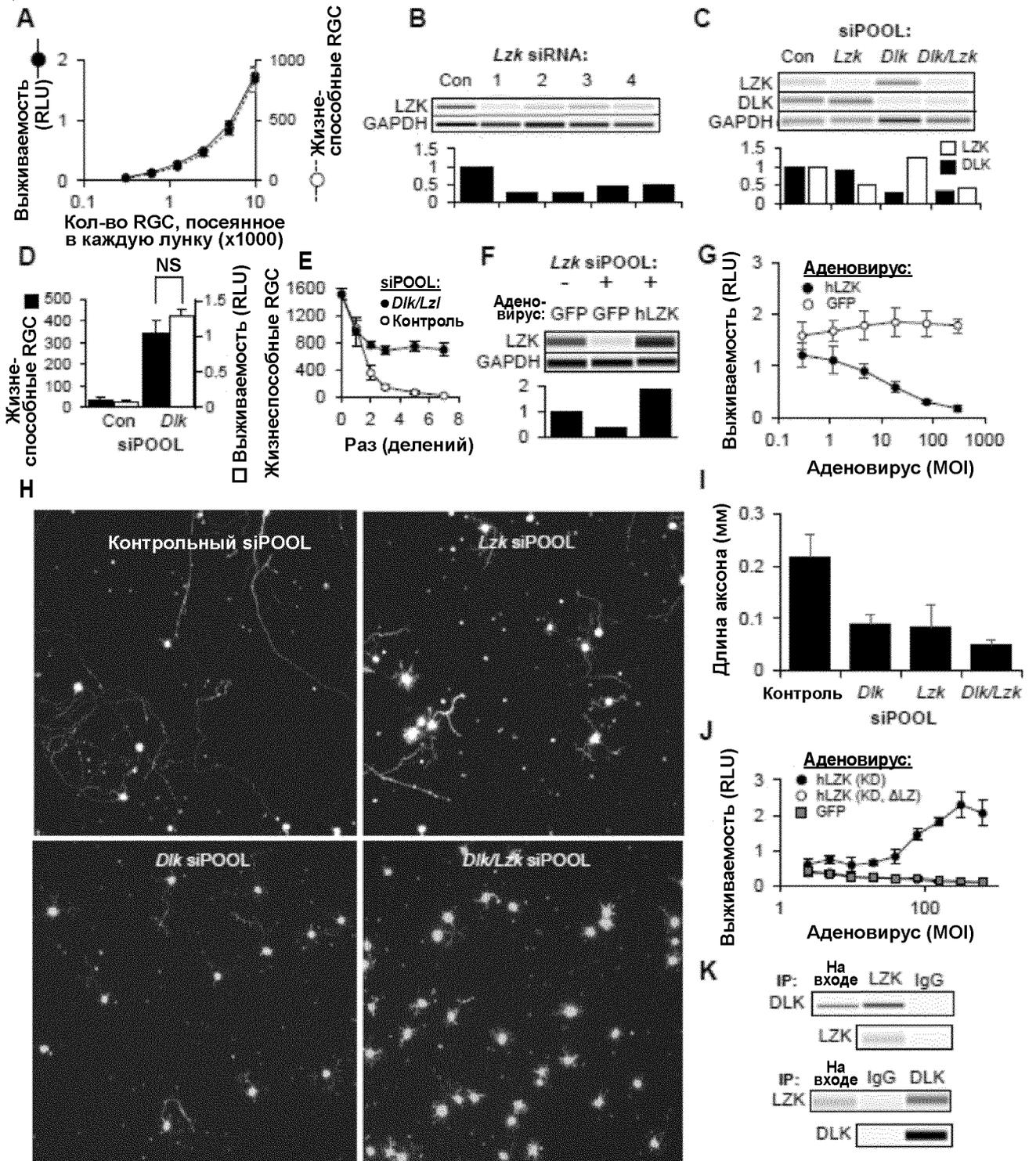
ФИГ.60А



ФИГ.60В

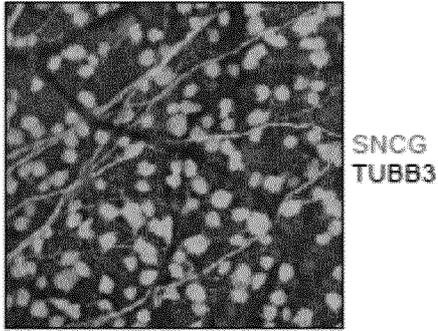


ФИГ.61

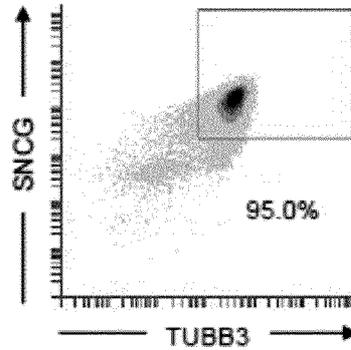


ФИГ.62

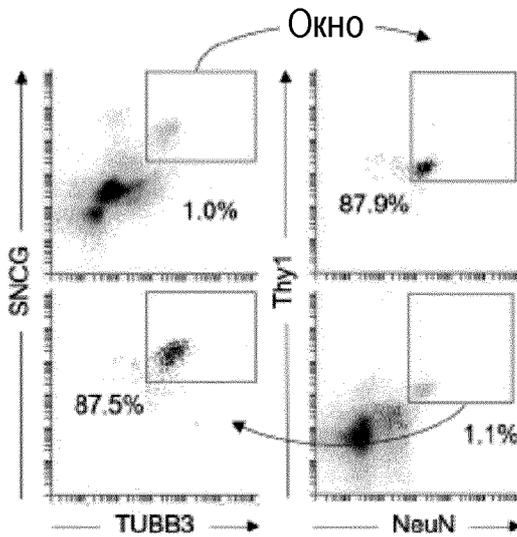
A



B



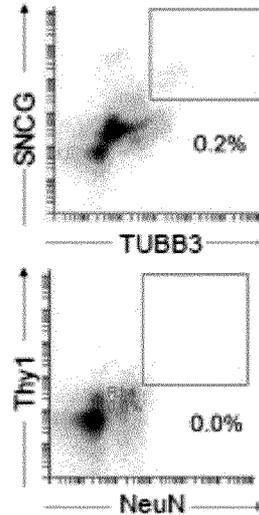
C



$0.9 \pm 0.1$	$86.5 \pm 4.9$
$85.9 \pm 2.0$	$0.9 \pm 0.2$

Клетки после установки  
дискриминационного окна (%)  
n=4

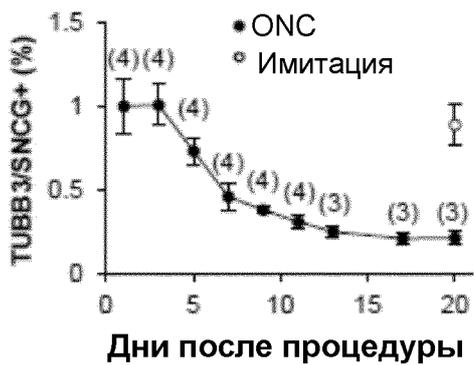
D



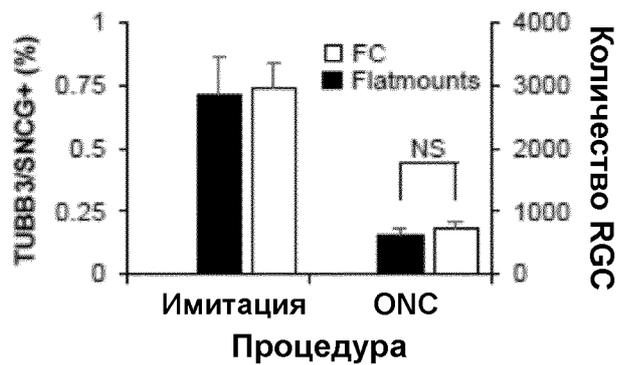
$0.2 \pm 0.0$
$0.0 \pm 0.0$

Клетки после установки  
дискриминационного окна (%)  
n=4

E



F



ФИГ.63

A

Скорректированный на затравочную последовательность анализ

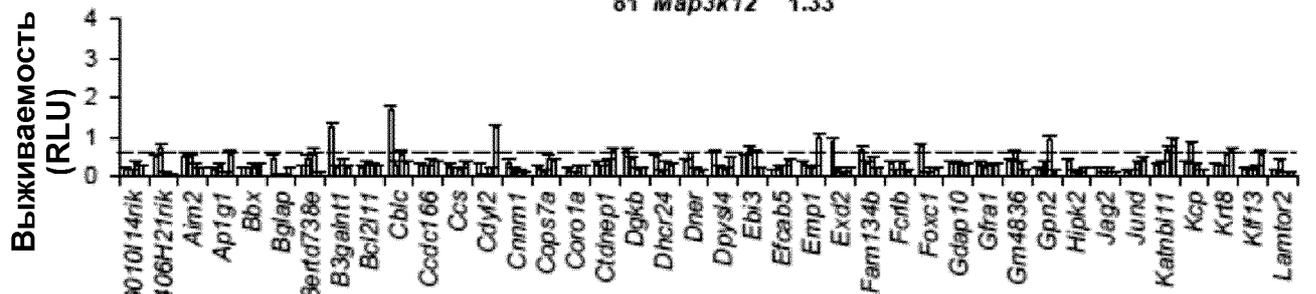
Место по порядку	Ген	Оценка	Место по порядку	Ген	Оценка	Место по порядку	Ген	Оценка
1	<i>Bglap</i>	2.63	17	<i>Gm4836</i>	1.67	33	<i>Copsa7</i>	1.54
2	<i>Ap1g1</i>	2.35	18	<i>Olfir890</i>	1.66	34	<i>Zic2</i>	1.54
3	<i>Rbm15b</i>	2.10	19	<i>Ebi3</i>	1.64	35	<i>Tdrd7</i>	1.53
4	<i>Fcrlb</i>	2.09	20	<i>Olfir1241</i>	1.64	36	<i>Foxc1</i>	1.53
5	<i>Vstm5</i>	1.91	21	<i>Vezt</i>	1.64	37	<i>C19orf53</i>	1.50
6	<i>Wrip1</i>	1.90	22	<i>Mefa2</i>	1.63	38	<i>Tmem86b</i>	1.49
7	<i>Atf2</i>	1.89	23	<i>Dpysl4</i>	1.58	39	<i>Txndc2</i>	1.48
8	<i>Bbc3</i>	1.89	24	<i>Ctdnep1</i>	1.58	40	<i>Cnnm1</i>	1.48
9	<i>Ccs</i>	1.87	25	<i>Nkx2-8</i>	1.58	41	<i>Serpinb6</i>	1.46
10	<i>Fgf7</i>	1.81	26	<i>Gdap10</i>	1.58	42	<i>Sorbs2</i>	1.44
11	<i>C15orf29</i>	1.76	27	<i>Pcdhb14</i>	1.57	43	<i>Krt8</i>	1.43
12	<i>Suv420h2</i>	1.73	28	<i>Coroa1</i>	1.57	44	<i>Pou4f1</i>	1.43
13	<i>Exd2</i>	1.73	29	<i>Trpc4ap</i>	1.56	45	<i>Ccdc166</i>	1.42
14	<i>Map2k7</i>	1.72	30	<i>Nqo2</i>	1.56	46	<i>Cblc</i>	1.41
15	<i>Map2k4</i>	1.71	31	<i>Olfir458</i>	1.55	47	<i>Park7</i>	1.39
16	<i>Ubtf</i>	1.69	32	<i>Efcab5</i>	1.55	48	<i>Ccdc104</i>	1.39
						81	<i>Map3k12</i>	1.33

B

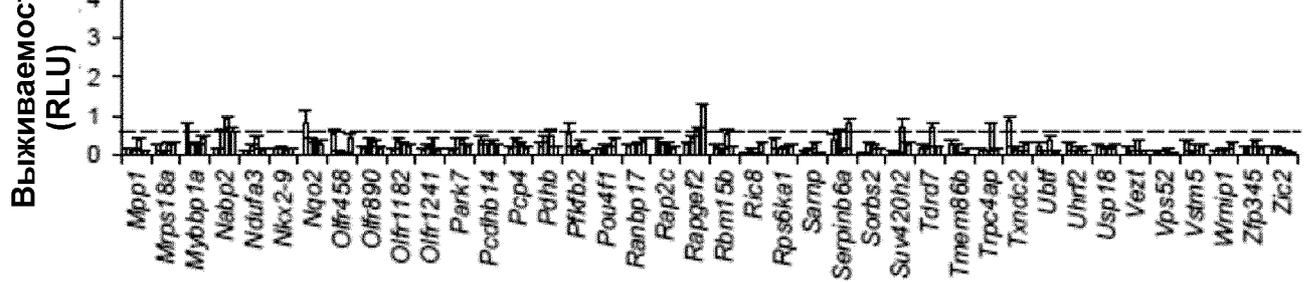
Анализ Хейстека

Место по порядку	Ген	P-значение
1	<i>Bbc3</i>	4.62E-53
2	<i>Cpne8</i>	1.14E-46
3	<i>Atf2</i>	5.87E-28
8	<i>Setd8</i>	2.19E-19
9	<i>Map3k12</i>	2.61E-19
14	<i>Spry3</i>	1.04E-15
15	<i>Vtcn1</i>	1.24E-15
16	<i>Elf2d</i>	1.20E-13
17	<i>Sh3bp1</i>	3.56E-13
18	<i>Mpp4</i>	7.82E-13
19	<i>Hoxb13</i>	1.66E-12
21	<i>Cript</i>	1.66E-12
22	<i>Fam24a</i>	7.29E-12
23	<i>Map2k4</i>	8.95E-12

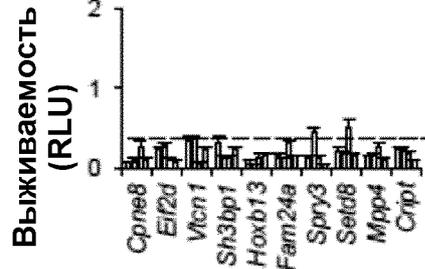
C



D



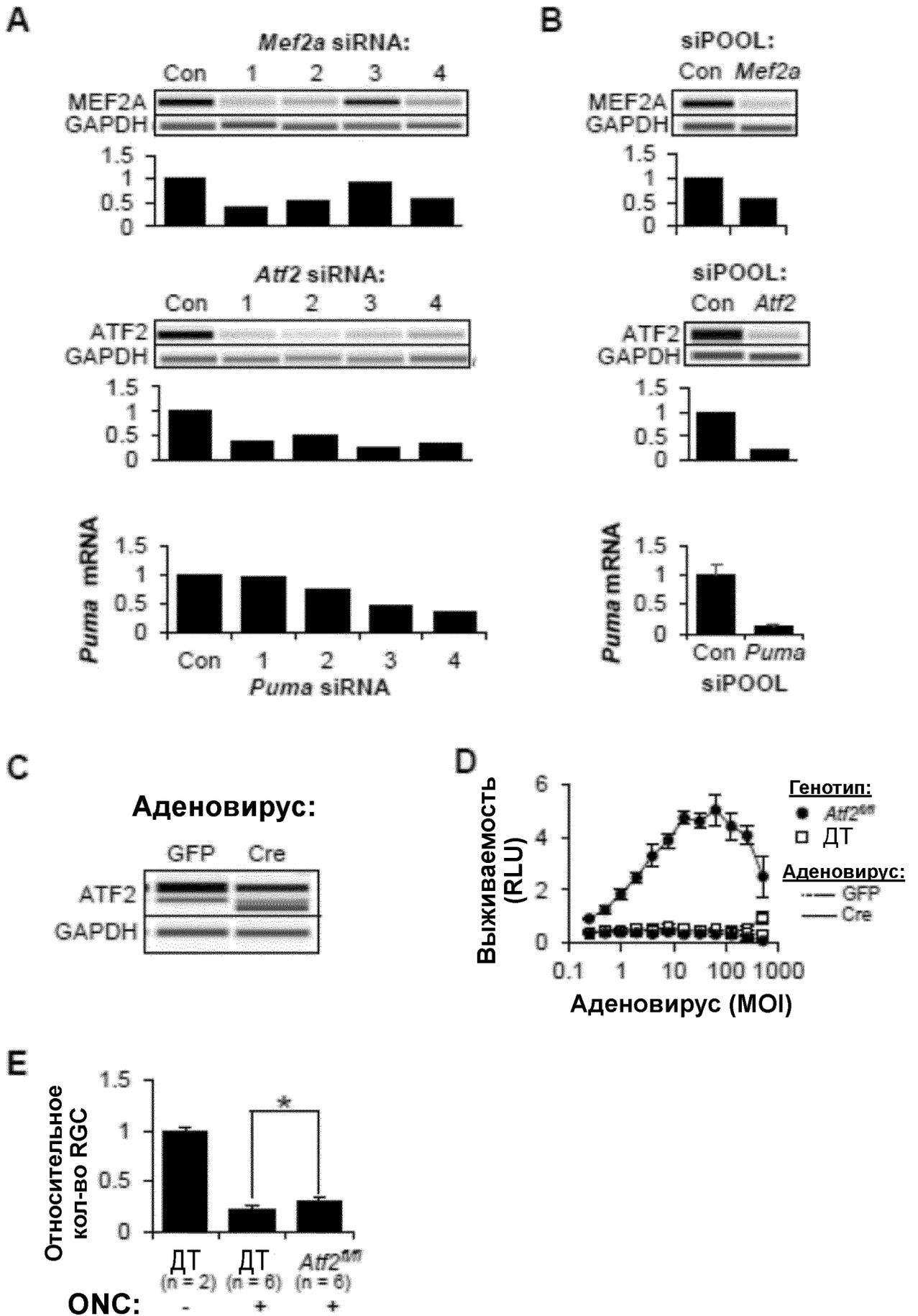
E



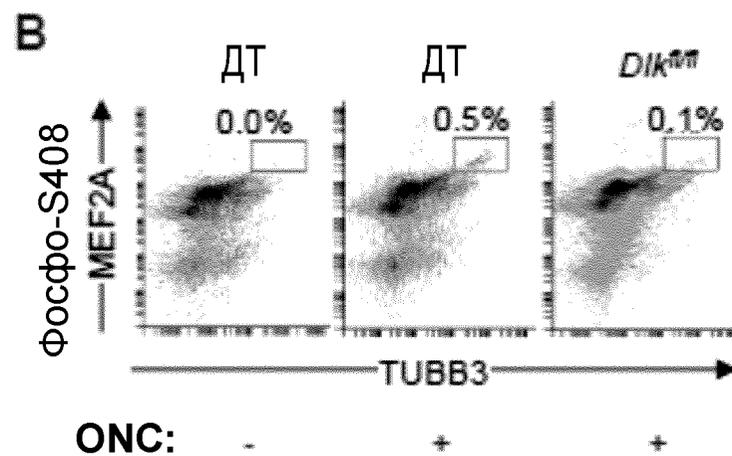
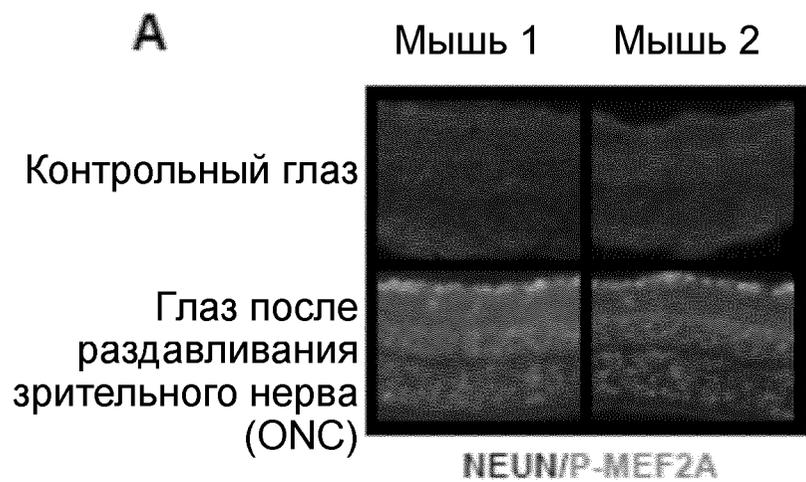
Ген

Ген

ФИГ.64



ФИГ.65



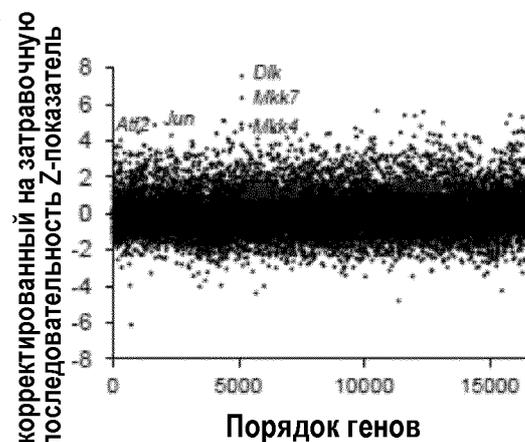
## ФИГ.66

А

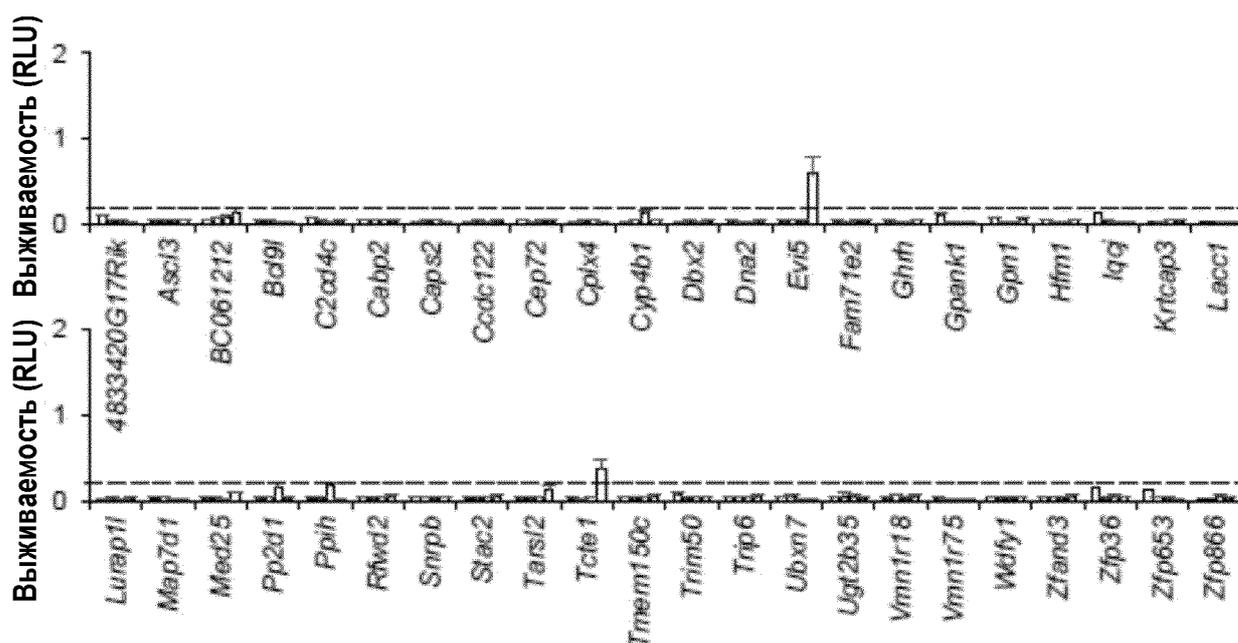
## Скорректированный на затравочную последовательность анализ

Место по порядку	Ген	Оценка	Место по порядку	Ген	Оценка	Место по порядку	Ген	Оценка
1	Map3k12	7.56	17	lqcj	4.80	33	4833420G17Rk	4.33
2	Map2k7	6.37	18	Gpn1	4.69	34	Stac2	4.33
3	Gpank1	5.66	19	Map2k4	4.64	35	C2cd4c	4.32
4	Lacc1	5.58	20	Hfm1	4.58	36	Tmem150c	4.31
5	Zfp653	5.43	21	Med25	4.52	37	Jun	4.30
6	Pp2d1	5.41	22	Ascl3	4.50	38	Dbx2	4.27
7	Vmn1r75	5.37	23	Dna2	4.50	39	Ubxn7	4.27
8	Zfp866	5.29	24	Zfp36	4.48	40	Vmn1r18	4.26
9	Evi5	5.16	25	Caps2	4.48	41	Cep72	4.23
10	Tcte1	5.12	26	Cyp4b1	4.47	42	Ugt2b35	4.19
11	Zfand3	5.07	27	Ccdc122	4.45	43	BC061212	4.17
12	Cplx4	5.00	28	BC30004HD1Rk	4.42	44	Map7d1	4.17
13	Tarsl2	4.97	29	Snrpb	4.41	45	Ppih	4.16
14	Rfwd2	4.91	30	Krtcap3	4.40	46	Fam71e2	4.15
15	Ghrh	4.86	31	Trim50	4.38	47	Bcl9l	4.14
16	Cabp2	4.82	32	Wdfy1	4.37	48	Lurap1l	4.13

В



С

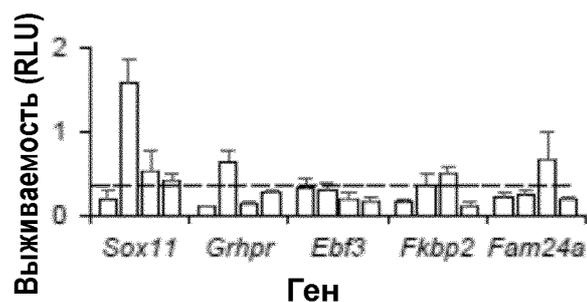


D

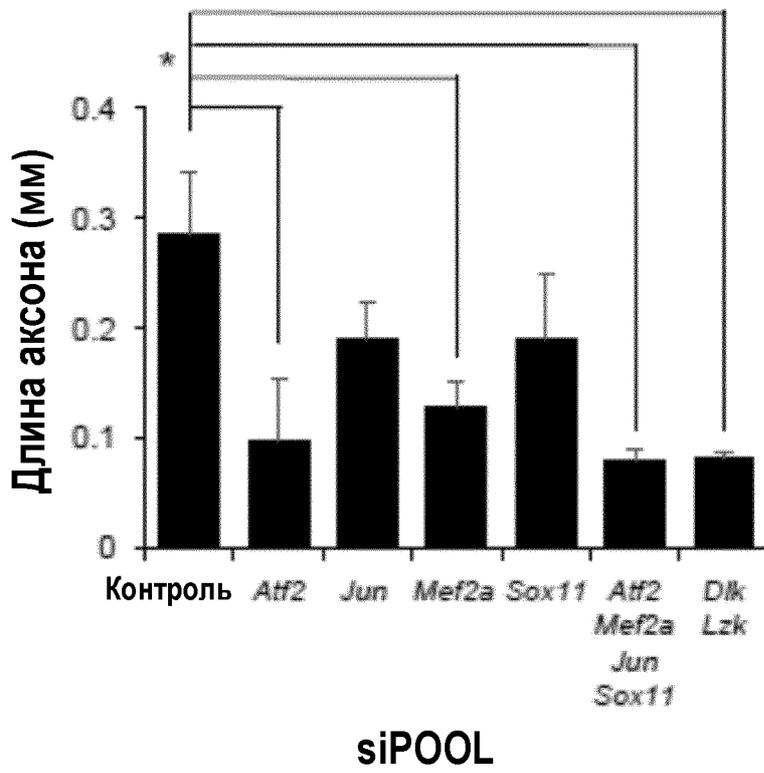
## Анализ Хейстека

Место по порядку	Ген	P-значение
1	Sox11	1.82E-24
2	Map2k4	2.43E-22
3	Bbc3	1.14E-20
5	Fkbp2	4.72E-11
7	Grhpr	1.98E-08
8	Fam24a	2.95E-08
10	Ebf3	1.84E-07

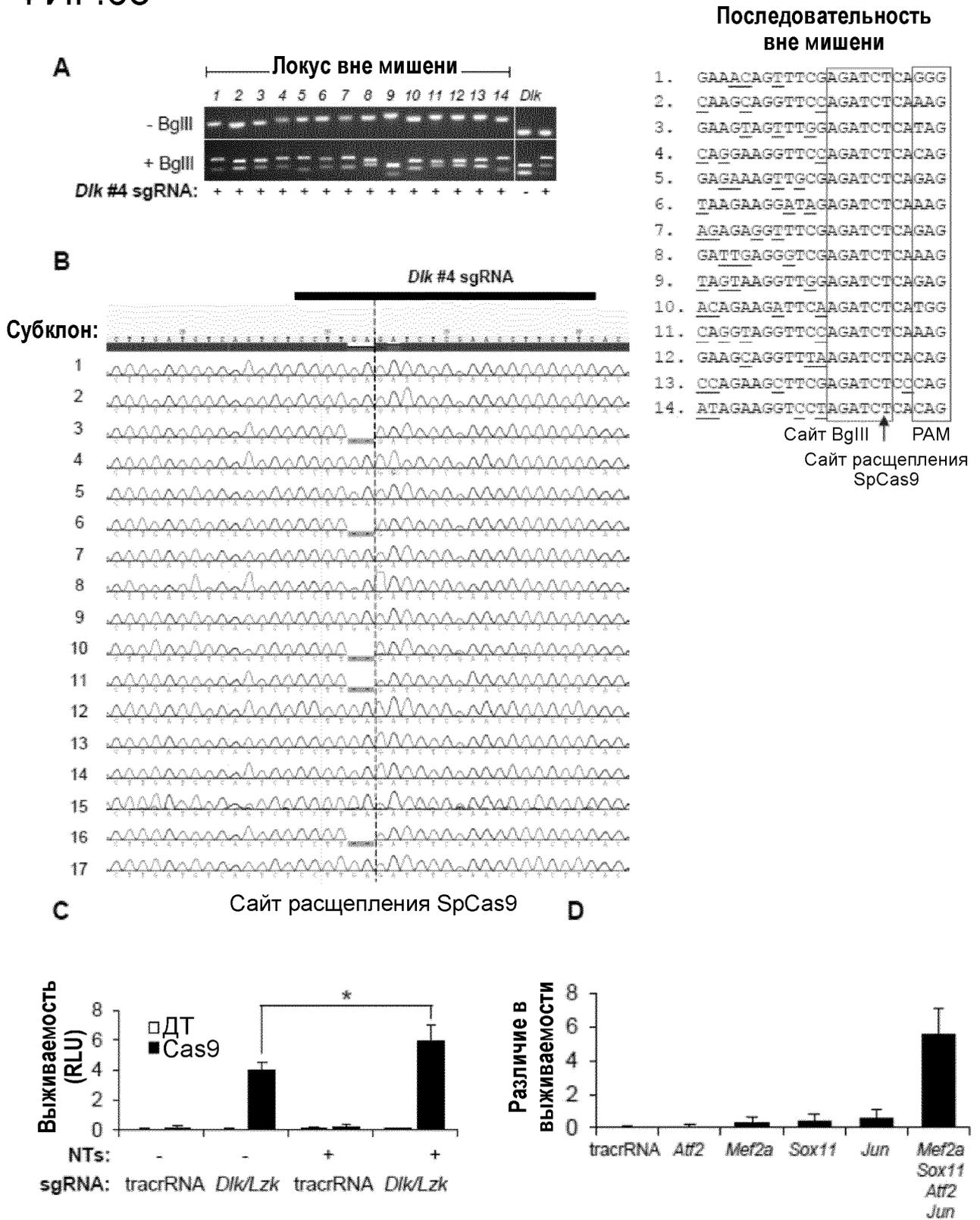
E



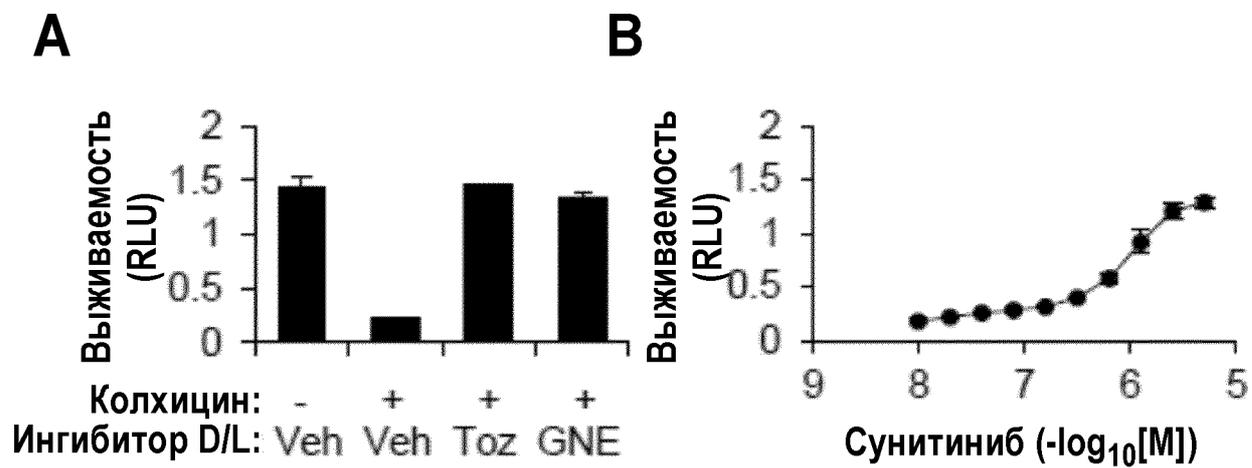
ФИГ.67



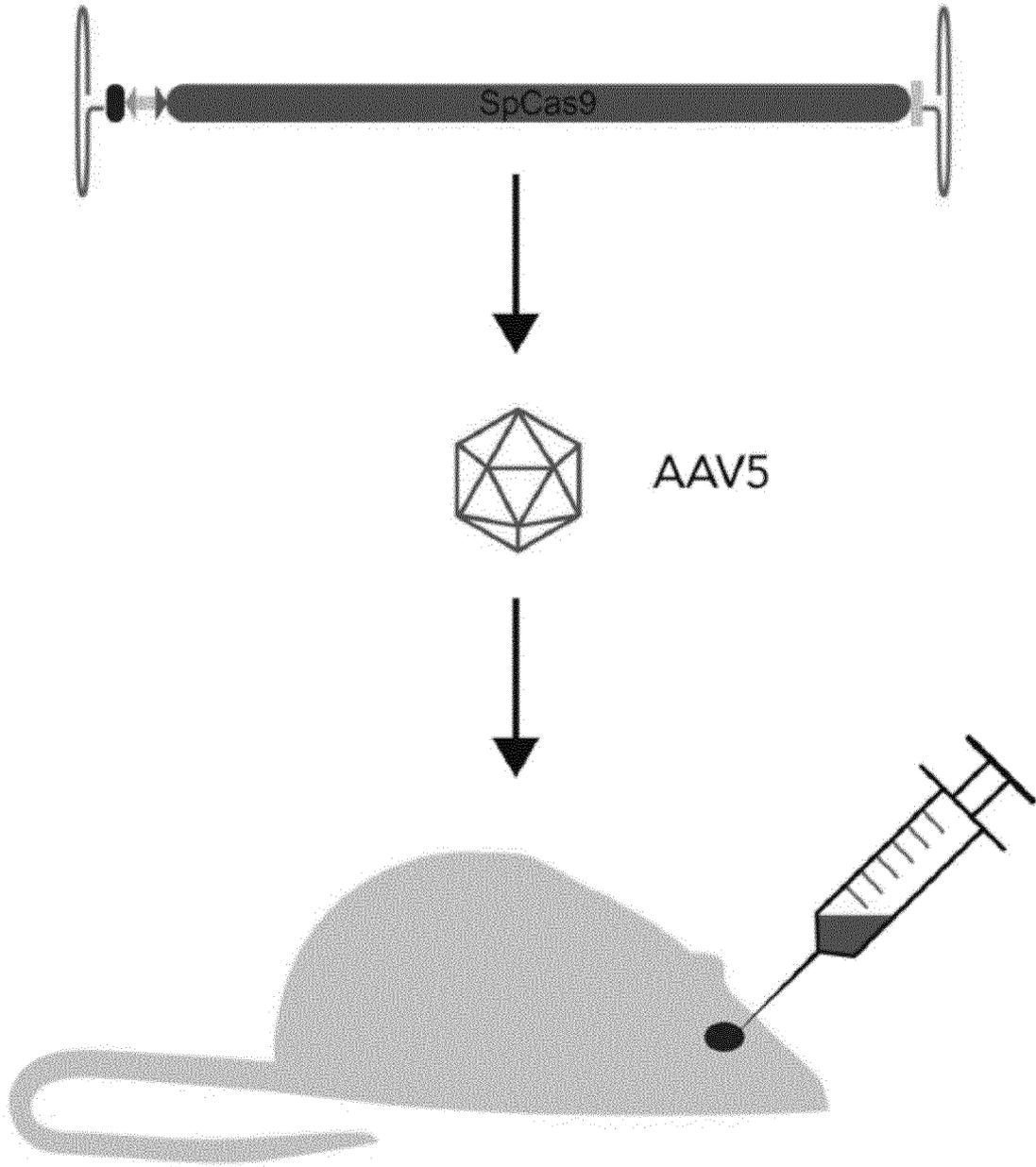
ФИГ.68



ФИГ.69



ФИГ.70



## ФИГ.71

## pCas9hSV40

Терминатор  
SV40*S. pyrogenes* Cas9

AvrII

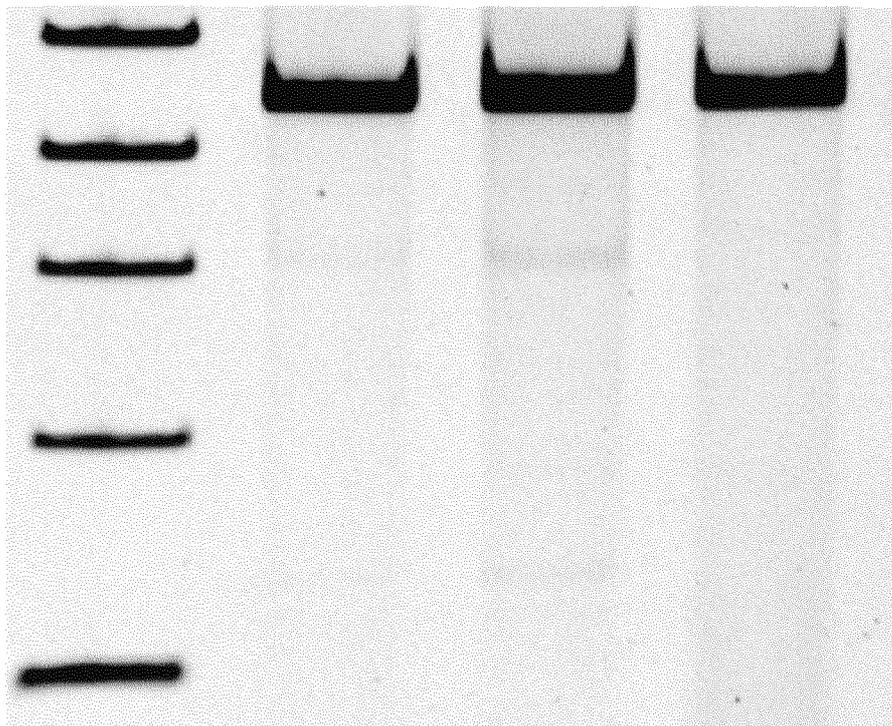
Промотор Н1 Каркасная  
структура gRNAДвунаправленный  
промотор Н1  
(человека)

Терминатор SV40

4704 п.о.

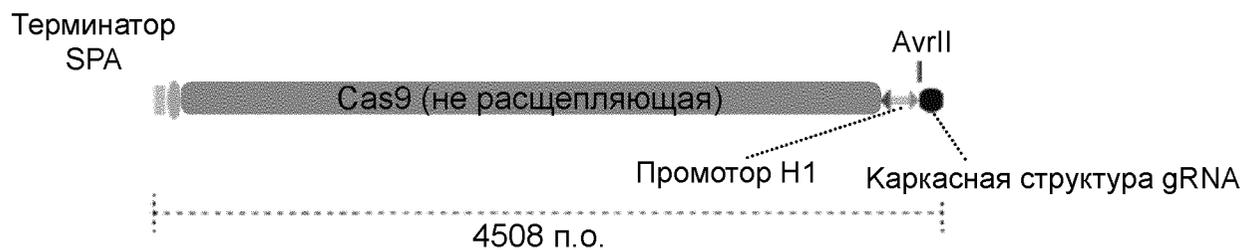
через 14 дней  
после инъекциичерез 28 дней  
после инъекции

контроль



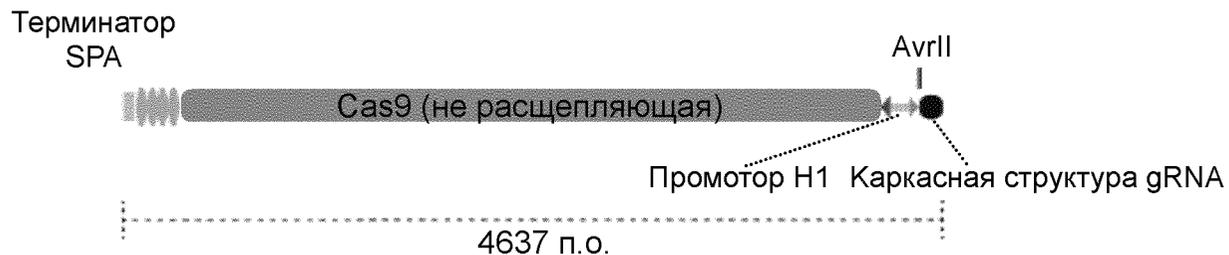
ФИГ.72

**pCas9(ND)mVP16**



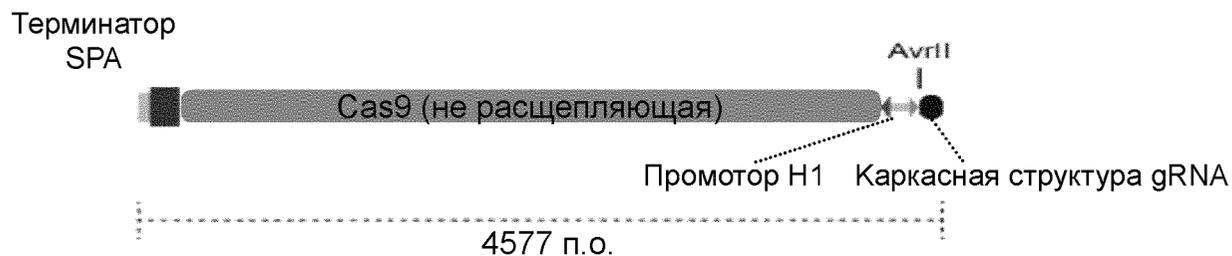
- ↔ Двухнаправленный промотор H1 (мыши)
- ▬ Терминатор SPA
- ▭ Активаторный домен VP16

**pCas9(ND)mVP64**



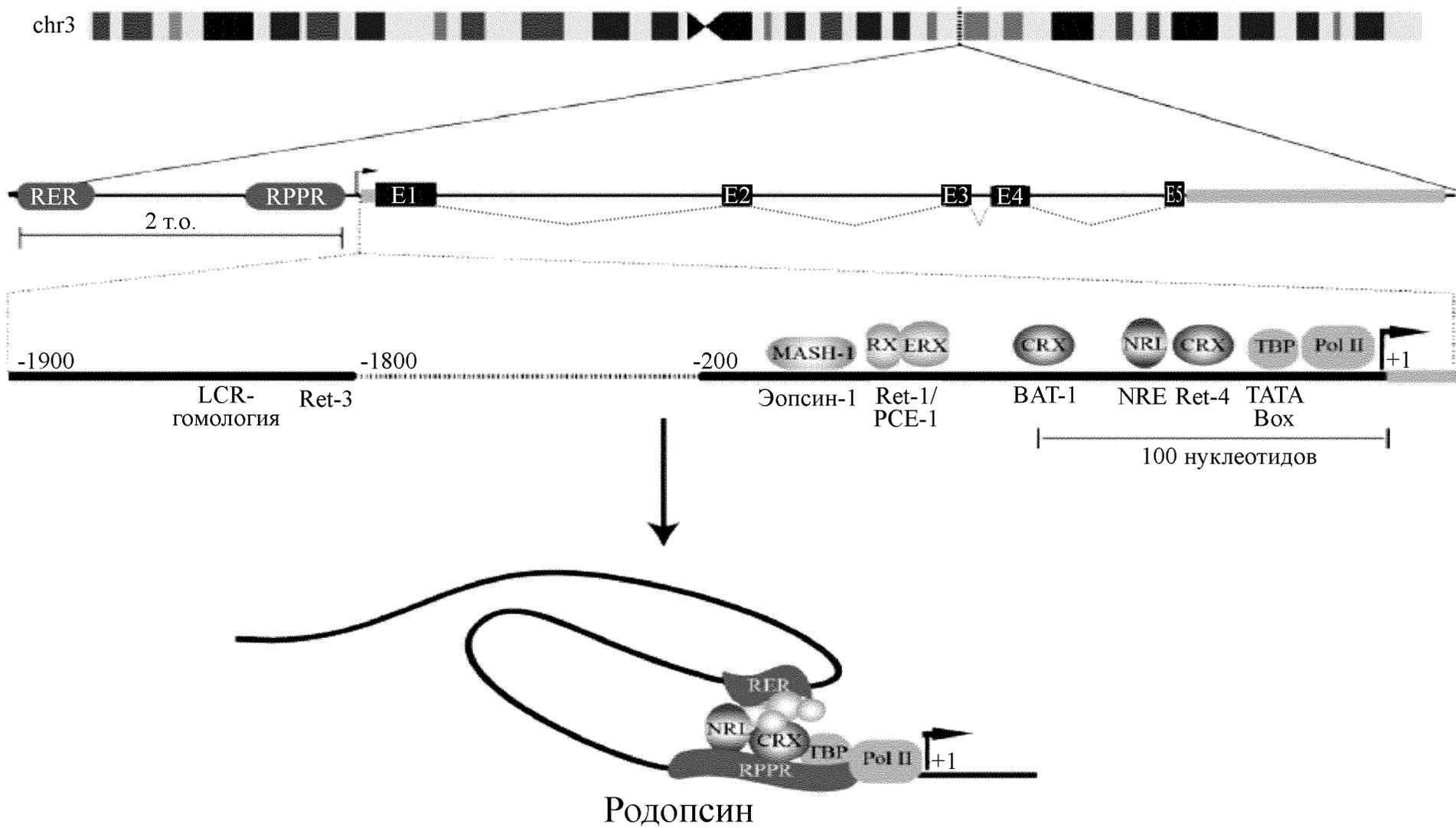
- ↔ Двухнаправленный промотор H1 (мыши)
- ▬ Терминатор SPA
- ▭ Активаторный домен VP64

**pCas9(ND)mSID**



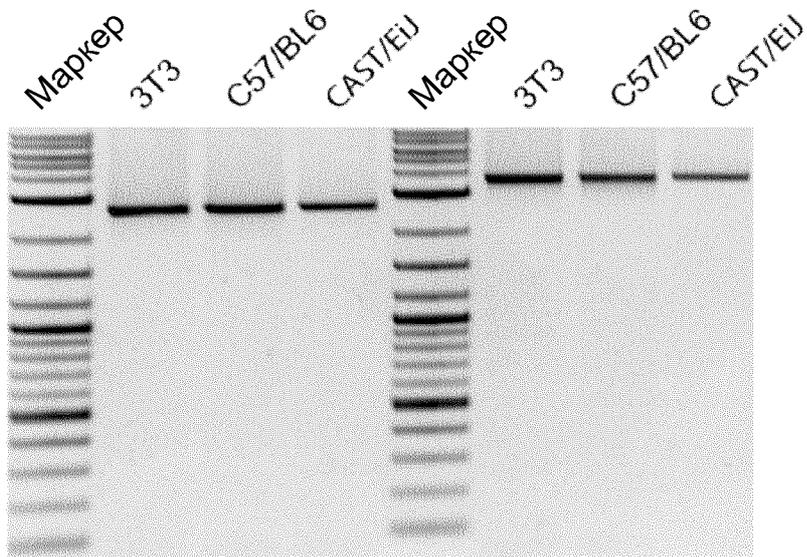
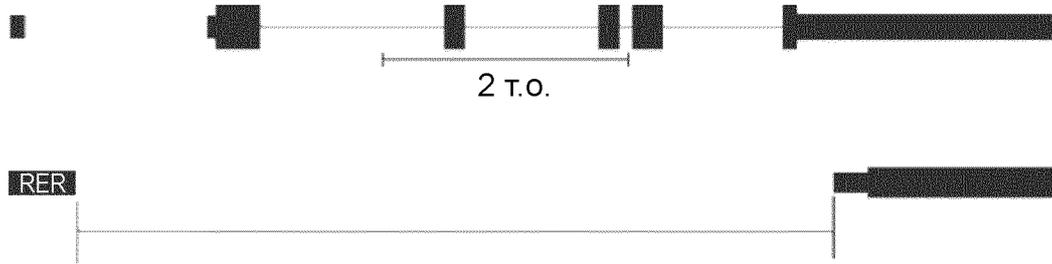
- ↔ Двухнаправленный промотор H1 (мыши)
- ▬ Терминатор SPA
- ▭ Репрессорный домен Sid

ФИГ.73

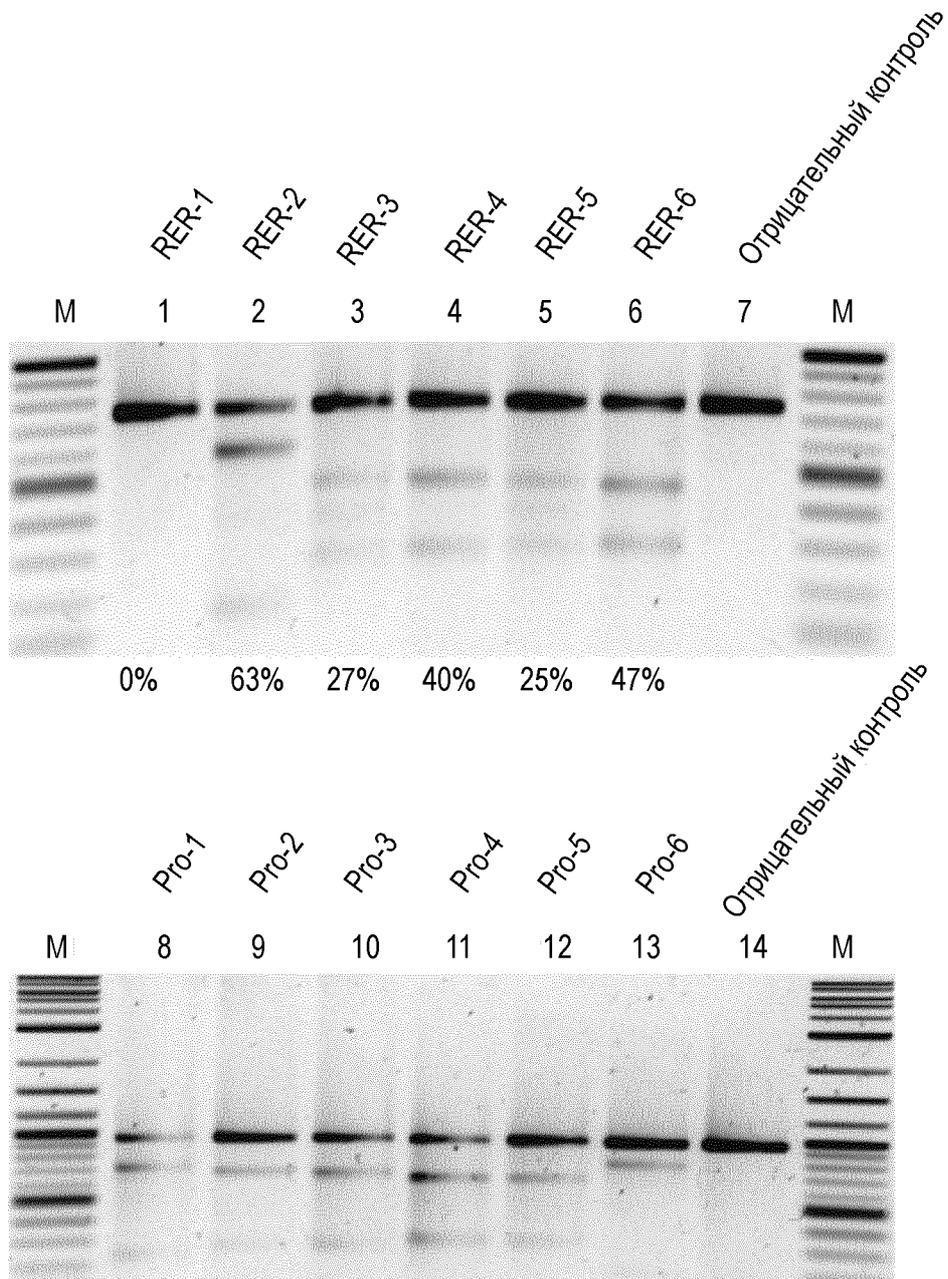
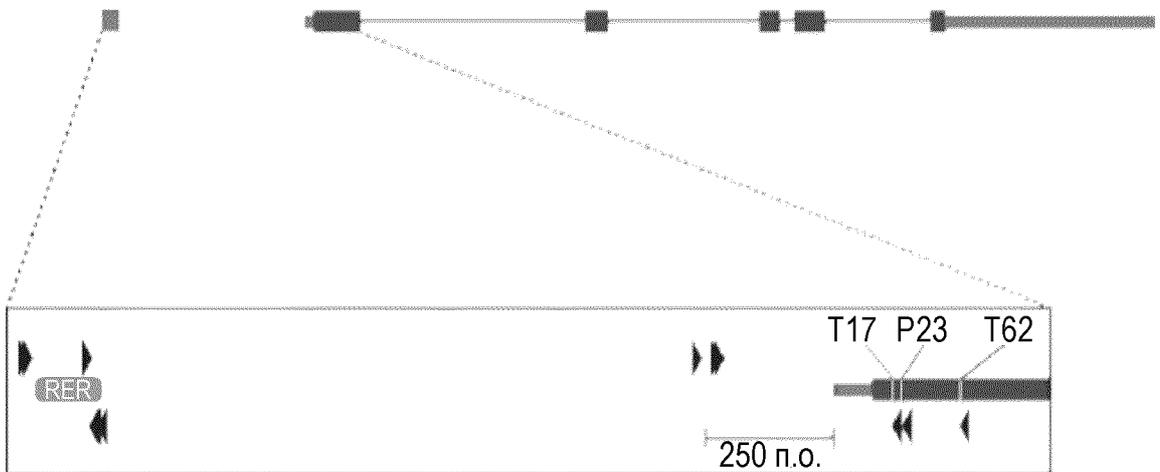


99/103

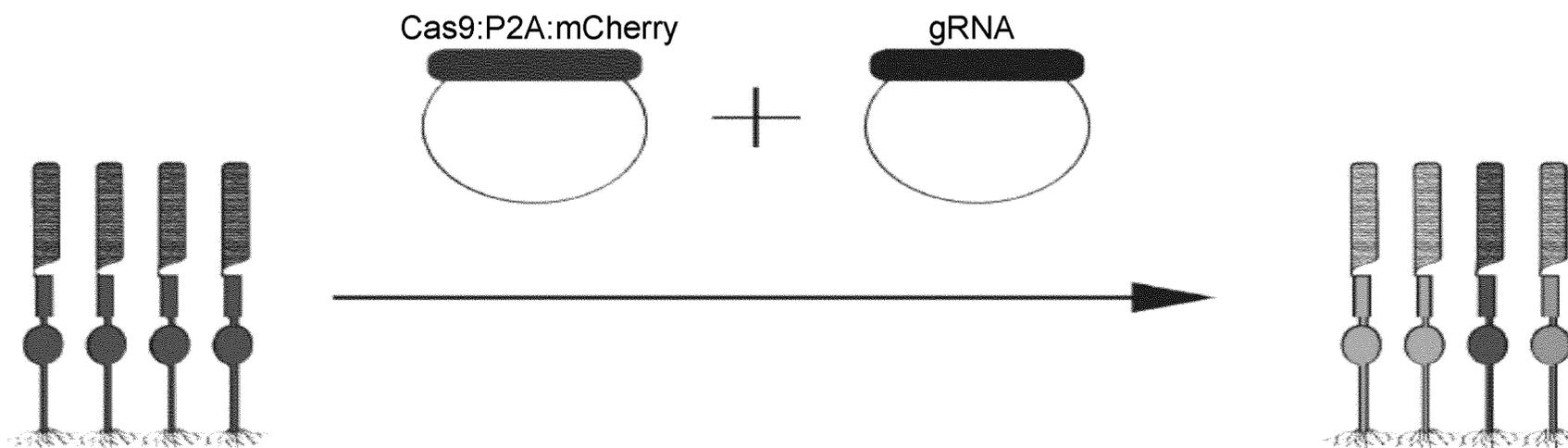
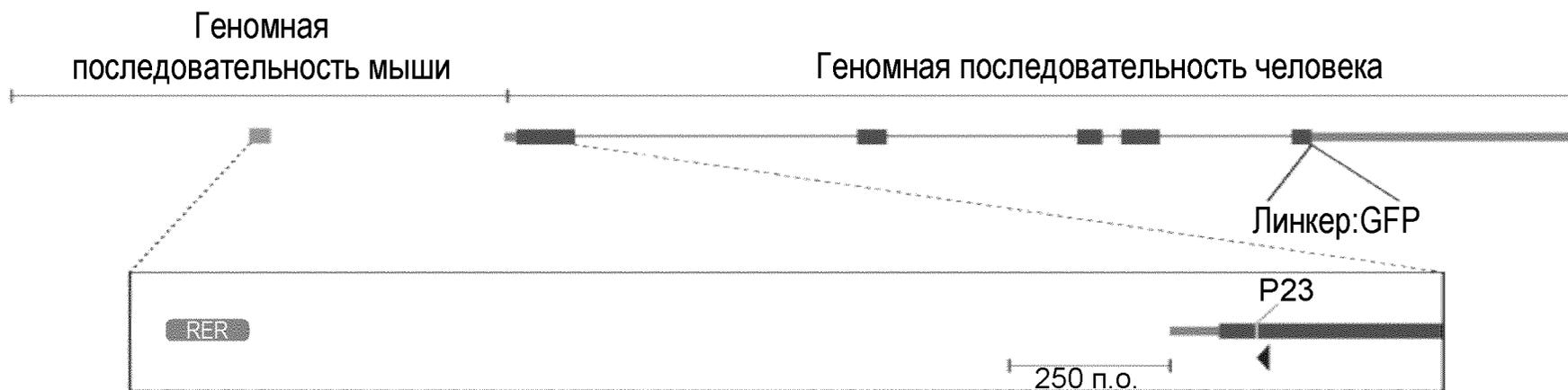
ФИГ.74



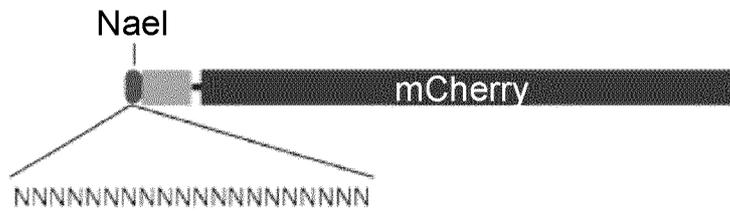
ФИГ.75



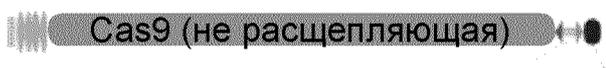
ФИГ.76



ФИГ.77



Терминатор  
SPA



промотор H1 каркасная структура gRNA

+

