

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202090874** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки
2021.02.03

(22) Дата подачи заявки
2018.09.28

(51) Int. Cl. *C12N 15/113* (2010.01)
C12N 15/10 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)

(54) **КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ РЕДАКТИРОВАНИЯ ГЕНА TTR И ЛЕЧЕНИЯ
ТРАНСИРЕТИНОВОГО АМИЛОИДОЗА (ATTR)**

(31) **62/566,236; 62/671,902**

(32) **2017.09.29; 2018.05.15**

(33) **US**

(86) **PCT/US2018/053382**

(87) **WO 2019/067872 2019.04.04**

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

(72) Изобретатель:

**Канджолия Арти Махендра Пракаш,
Одате Сёбу, Сайцер Джессика Линн,
Лескарбо Рейнальд Майкл, Стрэппс
Уолтер (US)**

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

(57) Предложены композиции и способы редактирования, например введением двухцепочечных разрывов (DSB), в гене TTR. Предложены композиции и способы лечения субъектов с амилоидозом, связанным с наличием транстиртина (ATTR).

A1

202090874

202090874

A1

**КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ РЕДАКТИРОВАНИЯ ГЕНА TTR И ЛЕЧЕНИЯ
ТРАНСТИРЕТИНОВОГО АМИЛОИДОЗА (ATTR)**

[1] Настоящей заявкой испрашивается приоритет по отношению к предварительной заявке на патент США № 62/556236, поданной 29 сентября 2017 года, и предварительной заявке № 62/671902 США, поданной 15 мая 2018 года, которые полностью включены в настоящую заявку посредством ссылки.

[2] Заявка, рассматриваемая в данный момент, содержит перечень последовательностей, которые представлены в электронном формате ASCII и полностью включены в настоящую заявку посредством ссылки. Указанная копия ASCII, созданная 27 сентября 2018 года, названа 2018-09-27_01155-0013-PCST_ST25.txt, размером 417 471 байт.

[3] Транстиретин (TTR) является белком, который экспрессируется геном *TTR* и обычно в организме транспортирует ретинол и тироксин. TTR преимущественно синтезируется в печени, в незначительно количестве синтезируется в хориоидном сплетении мозга и сетчатке. TTR обычно циркулирует в крови как растворимый тетрамерный белок.

[4] Патогенные варианты TTR, при которых может нарушаться стабильность тетрамера, могут кодироваться мутантными аллелями гена *TTR*. Мутация TTR может привести к нарушению свертывания (фолдинга) TTR с возможным формированием амилоидов (то есть, к скоплению белка TTR, с нарушенной конформацией). В некоторых случаях, аномальные варианты TTR могут привести к амилоидозу, или заболеванию, возникающему вследствие образования амилоидов. Например, мономеры, с нарушенной конформацией TTR, могут полимеризоваться в амилоидные фибриллы в тканях, таких как периферические нервы, сердце и желудочно-кишечный тракт. Амилоидные бляшки могут также включать TTR «дикого типа», который откладывается на TTR с нарушенной конформацией.

[5] Депонирование дикого типа TTR с нарушенной конформацией также наблюдалось у мужчин в возрасте 60 лет, или старше, и ассоциируется с проблемами сердечного ритма, сердечной недостаточности и запястного канала.

[6] Амилоидоз, который характеризуется депонированием TTR, может упоминаться как «ATTR», «амилоидоз - ассоциированный с TTR», «амилоидоз TTR» или «амилоидоз ATTR», «ATTR семейный амилоидоз» (при наследственной генетической мутации), или «ATTRwt» или «дикого» типа ATTR (при изменении конформации и депонирования TTR «дикого» типа).

[7] ATTR может презентовать широкий спектр симптомов, а пациенты с различным этиопатогенезом ATTR, могут иметь различные характеристики и прогнозы. Некоторые формы ATTR включают семейную амилоидную полинейропатию (FAP), семейную амилоидную кардиомиопатию (FAC), и амилоидоз TTR дикого типа (амилоидоз wt-TTR). FAP обычно презентует сенсорно-двигательную невропатию, в то время как FAC и

амилоидоз wt-TTR, как правило, презентуют застойную сердечную недостаточность. FAP и FAS, как правило, связывают с генетической мутацией в гене TTR, и свыше 100 различных мутаций гена *TTR* ассоциированы с ATTR. Напротив, амилоидоз wt-TTR ассоциирован со старением, а не с мутацией гена *TTR*. Считается, что приблизительно 50 000 пациентов в мире, могут быть носителями FAP и FAS.

[8] В настоящее время известно уже более 100 мутаций в *TTR*, которые ассоциированы с ATTR, и определенные мутации более тесно связаны с нейропатией и/или кардиомиопатией. Например, мутации в T60 TTR связаны как с кардиомиопатией, так и с нейропатией; мутации в V30 тесно связаны с нейропатией; а мутации в V122 чаще ассоциируются с кардиомиопатией.

[9] Исследован ряд подходов к лечению ATTR, но отсутствуют лицензированные препараты, которые останавливают прогрессию заболевания и улучшают качество жизни. При том, что изучалась возможность трансплантации печени для лечения ATTR, использование такого подхода затормозилось, поскольку процедура сопровождается значительным риском, иногда с последующей прогрессией заболевания после трансплантации. Низкомолекулярные стабилизаторы, такие как дифлюнисал и тафамидис, кажется, замедляют, но не останавливают прогрессию ATTR.

[10] В настоящее время также исследуются подходы, использующие выключение гена малыми интерферирующими РНК (siRNA), антисенсорным нокдауном, или с помощью моноклональных антител, направленных на деструкцию амилоидных фибрилл. Однако несмотря на результаты предварительных данных по кратковременной супрессии экспрессии TTR, остается потребность в разработке препаратов, которые могут вызвать длительную супрессию TTR.

[11] Соответственно, представлены следующие варианты воплощения изобретения. Для некоторых вариантов воплощения изобретения в настоящем изобретении предложены композиции и способы, использующие РНК-гид с агентом, связывающим РНК гид с ДНК, такие как система CRISPR/Cas, с целью существенно уменьшить или нокаутировать экспрессию гена *TTR*, таким образом существенно снижая или устраняя продукцию белка TTR, связанного с ATTR. Существенное снижение или элиминация продукции белка TTR, связанного с ATTR через альтерацию гена *TTR*, может быть долгосрочным снижением или элиминацией.

РАСКРЫТИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[12] Вариантом воплощения 1 изобретения является способ индукции двухцепочечного разрыва (DSB) в гене *TTR*, включая доставку композиции в клетку, отличающийся тем, что композиция включает:

1. РНК гид, включающую последовательность гида, выбранную из SEQ ID №:5-82;
2. РНК гид, включающую по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидных последовательностей, выбранных из SEQ ID №:5-82; или:
3. РНК гид, включающую последовательность гида, которая идентична по меньшей мере на 99, 98, 97, 96, 95, 94, 93, 92, 91% или 90%, последовательности, выбранной из SEQ

ID №:5-82.

[13] Вариантом воплощения 2 изобретения является способ модификации гена *TTR*, включающий доставку композиции в клетку, отличающийся тем, что композиция включает (i) агент, связывающий РНК гид с ДНК или нуклеиновую кислоту, кодирующую агент, связывающий РНК гид с ДНК и (ii) РНК гид, включающую:

1. последовательность гида, выбранную из SEQ ID №:5-82;
2. по меньшей мере, 17, 18, 19, или 20 последовательностей смежных нуклеотидов, выбранных из SEQ ID №:5-82; или:
3. последовательность гида, которая, по меньшей мере, на 99, 98, 97, 96, 95, 94, 93, 92, 91% или 90% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID №:5-82.

[14] Вариантом воплощения 3 изобретения является способ лечения амилоидоза, ассоциированного с *TTR* (*ATTR*), включающий применение композиции у нуждающегося в нем субъекта, отличающийся тем, что композиция включает (i) агент, связывающий проводниковую РНК с ДНК или нуклеиновую кислоту, кодирующую агент, связывающий проводниковую РНК с ДНК и (ii) РНК гид, включающую:

1. последовательность гида, выбранную из SEQ ID №:5-82;
2. по меньшей мере, 17, 18, 19, или 20 смежных нуклеотидных последовательностей, выбранных из SEQ ID №:5-82; или
3. последовательность гида, которая по меньшей мере, на 99, 98, 97, 96, 95, 94, 93, 92, 91% или 90% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID №:5-82, обеспечивая тем самым лечение *ATTR*.

[15] Вариантом воплощения 4 изобретения является способ снижения концентрации сывороточного *TTR*, включающий применение композиции у нуждающегося в нем субъекта, отличающийся тем, что композиция включает (i) агент, связывающий проводниковую РНК с ДНК или нуклеиновую кислоту, кодирующую агент, связывающий проводниковую РНК с ДНК и (ii) РНК гид, включающую:

1. последовательность гида, выбранную из SEQ ID №:5-82;
2. по меньшей мере, 17, 18, 19, или 20 смежных последовательностей нуклеотидов, выбранных из SEQ ID №:5-82; или
3. последовательность гида, которая, по меньшей мере на 99, 98, 97, 96, 95, 94, 93, 92, 91% или 90% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID №:5-82, таким образом снижая концентрацию сывороточного *TTR*.

[16] Вариантом воплощения 5 изобретения является способ снижения или предотвращения накопления амилоидов или амилоидных фибрилл, у субъекта с предполагаемым *TTR*, включающий применение композиции у нуждающегося в нем субъекта, отличающийся тем, что композиция включает (i) агент, связывающий РНК гид с ДНК или нуклеиновую кислоту, кодирующую агент, связывающий РНК гид с ДНК и (ii) РНК гид, включающую:

1. последовательность гида, выбранную из SEQ ID №:5-82;
2. по меньшей мере, 17, 18, 19, или 20 смежных последовательностей нуклеотидов,

выбранных из SEQ ID №:5-82; или:

3. последовательность гида, которая по меньшей мере на 99, 98, 97, 96, 95, 94, 93, 92, 91% или 90% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID №:5-82, таким образом, снижая накопление амилоидов или амилоидных фибрилл.

[17] Вариантом воплощения 6 изобретения является композиция, включающая РНК гид, который содержит:

1. последовательность гида, выбранную из SEQ ID №:5-82;

2. по меньшей мере, 17, 18, 19, или 20 смежных последовательностей нуклеотидов, выбранных из SEQ ID №:5-82; или:

3. последовательность гида, которая по меньшей мере на 99, 98, 97, 96, 95, 94, 93, 92, 91% или 90%, идентична последовательности, выбранной из SEQ ID №:5-82.

[18] Вариантом воплощения 7 изобретения является композиция, включающая вектор, кодирующий РНК гида, отличающаяся тем, что РНК гида включает:

1. последовательность гида, выбранную из SEQ ID №:5-82;

2. по меньшей мере 17, 18, 19, или 20 смежных последовательностей нуклеотидов, выбранных из SEQ ID №:5-82; или:

3. последовательность гида, которая по меньшей мере на 99, 98, 97, 96, 95, 94, 93, 92, 91% или 90% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID №:5-82.

[19] Вариантом воплощения 8 изобретения является композиция по вариантам воплощения 6 или 7 изобретения, в которой используется индукция двухцепочечного разрыва (DSB) в пределах гена *TTR* клетки или у субъекта.

[20] Вариантом воплощения 9 изобретения является композиция по вариантам воплощения 6 или 7 изобретения, в которой используются модификации гена *TTR* в клетке или у субъекта.

[21] Вариантом воплощения 10 изобретения является композиция по вариантам воплощения 6 или 7 изобретения, которая используется при лечении амилоидоза, ассоциированного с *TTR* (ATTR) у субъекта.

[22] Вариантом воплощения 11 изобретения является композиция по вариантам воплощения 6 или 7 изобретения, которая используется для снижения концентрации сывороточного *TTR* у субъекта.

[23] Вариантом воплощения 12 изобретения является композиция по вариантам воплощения 6 или 7 изобретения, которая используется для снижения или предотвращения накопления амилоидов или амилоидных фибрилл у субъекта.

[24] Вариантом воплощения 13 изобретения является способ по любому из вариантов воплощения 1-5 или композиция для использования по любому из вариантов воплощения 8-12 изобретения, отличающиеся тем, что композиция снижает уровни *TTR* в сыворотке.

[25] Вариантом воплощения 14 изобретения является способ или композиция по варианту воплощения 13 изобретения отличающиеся тем, что уровни *TTR* в сыворотке снижены по меньшей мере на 50% по сравнению с сывороточными уровнями *TTR* перед

назначением композиции.

[26] Вариантом воплощения 12 изобретения является способ или композиция, по варианту воплощения 13 изобретения, отличающиеся тем, что уровни TTR в сыворотке снижены на 50-60%, 60-70%, 70-80%, 80-90%, 90-95%, 95-98%, 98-99%, или 99-100% по сравнению с уровнями TTR в сыворотке перед назначением композиции.

[27] Вариантом воплощения 16 изобретения является способ или композиция, по любому из вариантов воплощения 1-5 или вариантов воплощения 8-15 изобретения, отличающиеся тем, что композиция получена в результате редактирования гена *TTR*.

[28] Вариантом воплощения 17 изобретения является способ или композиция, по варианту воплощения 16 изобретения, отличающиеся тем, что редактирование рассчитано как процент от скорректированной выборки (нормализованный процент).

[29] Вариантом воплощения 18 изобретения является способ или композиция по варианту воплощения 17 изобретения, отличающиеся тем, что процент редактирования составляет от 30 до 99% в выборке.

[30] Вариантом воплощения 19 изобретения является способ или композиция по варианту воплощения 17 изобретения, отличающиеся тем, что процент редактирования составлял между 30 и 35%, 35 и 40%, 40 и 45%, 45 и 50%, 50 и 55%, 55 и 60%, 60 и 65%, 65 и 70%, 70 и 75%, 75 и 80%, 80 и 85%, 85 и 90%, 90 и 95%, или 95 и 99% в выборке.

[31] Вариантом воплощения 20 изобретения является способ по любому из вариантов воплощения 1-5 или композиция по любому из вариантов воплощения 8-19 изобретения, отличающиеся тем, что композиция снижает депонирование амилоида по меньшей мере в одной ткани.

[32] Вариантом воплощения 21 изобретения является способ или композиция по варианту воплощения 20 изобретения, отличающиеся тем, что по меньшей мере одна из тканей представляет собой одно или более из следующего: желудок, толстую кишку, седалищный нерв или ганглии дорсальных корешков спинного мозга.

[33] Вариантом воплощения 22 изобретения является способ или композиция по вариантам воплощения 20 или 21 изобретения, отличающиеся тем, что накопление амилоида измерено спустя 8 недель после назначения композиции.

[34] Вариантом воплощения 23 изобретения является способ или композиция по любому из вариантов воплощения 20-22 изобретения, отличающиеся тем, что накопление амилоидов определялось по сравнению с отрицательным контролем или с уровнем, измеренным перед назначением композиции.

[35] Вариантом воплощения 24 изобретения является способ или композиция по любому из вариантов воплощения 20-23 изобретения, отличающиеся тем, что накопление амилоида измерено в биопсийном образце и/или при иммунном окрашивании.

[36] Вариантом воплощения 25 изобретения является способ или композиция по любому из вариантов воплощения 20-24 изобретения, отличающиеся тем, что накопление амилоида было снижено между 30 и 35%, 35 и 40%, 40 и 45%, 45 и 50%, 50 и 55%, 55 и 60%, 60 и 65%, 65 и 70%, 70 и 75%, 75 и 80%, 80 и 85%, 85 и 90%, 90 и 95% или 95 и 99%

относительно этого показателя в отрицательном контроле.

[37] Вариантом воплощения 26 изобретения является способ или композиция по любому из вариантов воплощения 20-25 изобретения, отличающиеся тем, что накопление амилоида снижено между 30 и 35%, 35 и 40%, 40 и 45%, 45 и 50%, 50 и 55%, 55 и 60%, 60 и 65%, 65 и 70%, 70 и 75%, 75 и 80%, 80 и 85%, 85 и 90%, 90 и 95% или 95 и 99% относительно этого показателя, зарегистрированного перед назначением композиции.

[38] Вариантом воплощения 27 изобретения является способ или композиция по любому из вариантов воплощения 1-5 или вариантов воплощения 8-26 изобретения, отличающиеся тем, что композиция применяется или доставлена по меньшей мере два раза.

[39] Вариантом воплощения 28 изобретения является способ или композиция по варианту воплощения 27 изобретения, отличающиеся тем, что композиция применяется или доставлена по меньшей мере три раза.

[40] Вариантом воплощения 29 изобретения является способ или композиция по варианту воплощения 27 изобретения, отличающиеся тем, что композиция применяется или доставлена по меньшей мере четыре раза.

[41] Вариантом воплощения 30 изобретения является способ или композиция по варианту воплощения 27 изобретения, отличающиеся тем, что композиция применяется или доставлена до пяти, шести, семи, восьми, девяти или десяти раз.

[42] Вариантом воплощения 31 изобретения является способ или композиция по любому из вариантов воплощения 27-30 изобретения, отличающиеся тем, что назначение или доставка выполнены в интервале 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15 дней.

[43] Вариантом воплощения 32 изобретения является способ или композиция по любому из вариантов воплощения 27-30 изобретения, отличающиеся тем, что назначение или доставка выполнены в интервале 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15 недель.

[44] Вариантом воплощения 33 изобретения является способ или композиция по любому из вариантов воплощения 27-30 изобретения, отличающиеся тем, что назначение или доставка выполнены в интервале 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15 месяцев.

[45] Вариантом воплощения 34 изобретения является способ или композиция по любому из предыдущих вариантов воплощения, отличающиеся тем, что последовательность гида выбрана из SEQ ID №:5-82.

[46] Вариантом воплощения 35 изобретения является способ или композиция по любому из предыдущих вариантов воплощения, отличающиеся тем, что РНК гида по меньшей мере частично комплементарна целевой последовательности гена *TTR* человека.

[47] Вариантом воплощения 36 изобретения является способ или композиция по варианту воплощения 35 изобретения, отличающиеся тем, что целевая последовательность находится в 1, 2, 3, или 4 экзоне гена *TTR* человека.

[48] Вариантом воплощения 37 изобретения является способ или композиция по варианту воплощения 35 изобретения, отличающиеся тем, что целевая последовательность находится в 1 экзоне гена *TTR* человека.

[49] Вариантом воплощения 38 изобретения является способ или композиция по

варианту воплощения 35 изобретения, отличающиеся тем, что таргетная последовательность находится во 2 экзоне гена *TTR* человека.

[50] Вариантом воплощения 39 изобретения является способ или композиция по варианту воплощения 35 изобретения, отличающиеся тем, что таргетная последовательность находится в 3 экзоне гена *TTR* человека.

[51] Вариантом воплощения 40 изобретения является способ или композиция по варианту воплощения 35 изобретения, отличающиеся тем, что таргетная последовательность находится в 4 экзоне гена *TTR* человека.

[52] Вариантом воплощения 41 изобретения является способ или композиция по любому из вариантов воплощения 1-40 изобретения, отличающиеся тем, что последовательность гида комплементарна таргетной последовательности в положительной цепи *TTR*.

[53] Вариантом воплощения 42 изобретения является способ или композиция по любому из вариантов воплощения 1-40 изобретения, отличающиеся тем, что последовательность гида комплементарна таргетной последовательности в отрицательной цепи *TTR*.

[54] Вариантом воплощения 43 изобретения является способ или композиция по любому из вариантов воплощения 1-40 изобретения, отличающиеся тем, что первая последовательность гида комплементарна первой таргетной последовательности в положительной цепи гена *TTR*, а также отличающиеся тем, что композиция дополнительно включает вторую последовательность гида, которая комплементарна второй таргетной последовательности в отрицательной цепи гена *TTR*.

[55] Вариантом воплощения 44 изобретения является способ или композиция по любому из предыдущих вариантов воплощения, отличающиеся тем, что РНК гида включает crRNA, которая включает последовательность гида и дополнительно включает последовательность нуклеотида SEQ ID №: 126, отличающуюся тем, что нуклеотиды SEQ ID №: 126 следуют за последовательностью гида на ее 3' конце.

[56] Вариантом воплощения 45 изобретения является способ или композиция по любому из предыдущих вариантов воплощения, отличающиеся тем, что РНК гида является двухцепочечной РНК (dgRNA).

[57] Вариантом воплощения 46 изобретения является способ или композиция по варианту воплощения 45 изобретения, отличающиеся тем, что двухцепочечная РНК гид включает crRNA, включающую последовательность нуклеотида SEQ ID №: 126, отличающуюся тем, что нуклеотиды SEQ ID №: 126 следуют за последовательностью гида на ее 3' концах и trRNA.

[58] Вариантом воплощения 47 изобретения является способ или композиция по любому из вариантов воплощения 1-43 изобретения, отличающиеся тем, что РНК гид является одноцепочечной РНК гидом (sgRNA).

[59] Вариантом воплощения 48 изобретения является способ или композиция по варианту воплощения 47 изобретения, отличающиеся тем, что sgRNA включает

последовательность гида с профилем SEQ ID №: 3.

[60] Вариантом воплощения 49 изобретения является способ или композиция по варианту воплощения 47 изобретения, отличающиеся тем, что sgRNA включает последовательность SEQ ID №: 3.

[61] Вариантом воплощения 50 изобретения является способ или композиция по вариантам воплощения 48 или 49 изобретения, отличающиеся тем, что каждый N в ID SEQ №: 3 является любым естественным или искусственным нуклеотидом, отличающимся тем, что N, формируют последовательность гида и последовательность гида мишеней Cas9 к гену *TTR*.

[62] Вариантом воплощения 51 изобретения является способ или композиция по любому из вариантов воплощения 47-50 изобретения, отличающиеся тем, что sgRNA включает любую из последовательностей гида SEQ ID №:5-82 и нуклеотиды SEQ ID №: 126.

[63] Вариантом воплощения 52 изобретения является способ или композиция по любому из вариантов воплощения 47-51 изобретения, отличающиеся тем, что sgRNA включает последовательность гида, которая по меньшей мере на 99, 98, 97, 96, 95, 94, 93, 92, 91% или 90% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID №:87-124.

[64] Вариантом воплощения 53 изобретения является способ или композиция по варианту воплощения 47 изобретения, отличающиеся тем, что sgRNA включает последовательность, выбранную из SEQ ID №:87-124.

[65] Вариантом воплощения 54 изобретения является способ или композиция по любому из предыдущих вариантов воплощения, отличающиеся тем, что РНК гида включает по меньшей мере одну модификацию.

[66] Вариантом воплощения 55 изобретения является способ или композиция по варианту воплощения 54 изобретения, отличающиеся тем, что по меньшей мере одна модификация включает 2'-О-метил (2'-O-Me) модифицированный нуклеотид.

[67] Вариантом воплощения 56 изобретения является способ или композиция по вариантам воплощения 54 или 55 изобретения, отличающиеся тем, что по меньшей мере одна модификация включает фосфоротиоатную (PS) связь между нуклеотидами.

[68] Вариантом воплощения 57 изобретения является способ или композиция по любому из вариантов воплощения 54-56 изобретения, отличающиеся тем, что по меньшей мере одна модификация включает 2'-фтор (2'-F) модифицированный нуклеотид.

[69] Вариантом воплощения 58 изобретения является способ или композиция по любому из вариантов воплощения 54-57 изобретения, отличающиеся тем, что по меньшей мере одна модификация включает модификацию в одном или более из первых пяти нуклеотидов на 5' концах.

[70] Вариантом воплощения 59 изобретения является способ или композиция по любому из вариантов воплощения 54-58 изобретения, отличающиеся тем, что по меньшей мере одна модификация включает модификацию в одном или более из первых пяти нуклеотидов на 3' концах.

[71] Вариантом воплощения 60 изобретения является способ или композиция по любому из вариантов воплощения 54-59 изобретения, отличающиеся тем, что по меньшей мере одна модификация включает связь PS между первыми четырьмя нуклеотидами.

[72] Вариантом воплощения 61 изобретения является способ или композиция по любому из вариантов воплощения 54-60 изобретения, отличающиеся тем, что по меньшей мере одна модификация включает связь PS между последними четырьмя нуклеотидами.

[73] Вариант воплощения 62 изобретения является способ или композиция по любому из вариантов воплощения 54-61 изобретения, отличающиеся тем, что по меньшей мере одна модификация включает модифицированные нуклеотиды 2'-O-Me в первых трех нуклеотидах на 5' концах.

[74] Вариантом воплощения 63 изобретения является способ или композиция по любому из вариантов воплощения 54-62 изобретения, отличающиеся тем, что по меньшей мере одна модификация включает модифицированные нуклеотиды 2'-O-Me в последних трех нуклеотидах на 3' концах.

[75] Вариантом воплощения 64 изобретения является способ или композиция по любому из вариантов воплощения 54-63 изобретения, отличающиеся тем, что РНК гида включает модифицированные нуклеотиды SEQ ID №: 3.

[76] Вариантом воплощения 65 изобретения является способ или композиция по любому из вариантов воплощения 1-64 изобретения, отличающиеся тем, что композиция дополнительно включает фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество.

[77] Вариантом воплощения 66 изобретения является способ или композиция по любому из вариантов воплощения 1-65 изобретения, отличающиеся тем, что РНК гида связана с липидной наночастицей (LNP).

[78] Вариантом воплощения 67 изобретения является способ или композиция по варианту воплощения 66 изобретения, отличающиеся тем, что LNP включает липид CCD.

[79] Вариантом воплощения 68 изобретения является способ или композиция по варианту воплощения 67 изобретения, отличающиеся тем, что липид CCD является липидом А или липидом В.

[80] Вариантом воплощения 69 изобретения является способ или композиция по вариантам воплощения 66-68 изобретения, отличающиеся тем, что LNP включает нейтральный липид.

[81] Вариантом воплощения 70 изобретения является способ или композиция по варианту воплощения 69 изобретения, отличающиеся тем, что нейтральным липидом является DSPC.

[82] Вариантом воплощения 71 изобретения является способ или композиция по любому из вариантов воплощения 66-70 изобретения, отличающиеся тем, что LNP включает липид хелпер.

[83] Вариантом воплощения 72 изобретения является способ или композиция по варианту воплощения 71 изобретения, отличающиеся тем, что липидом хелпером является холестерин.

[84] Вариантом воплощения 73 изобретения является способ или композиция по любому из вариантов воплощения 66-72 изобретения, отличающиеся тем, что LNP включает липид-невидимку.

[85] Вариантом воплощения 74 изобретения является способ или композиция по варианту воплощения 73 изобретения, отличающиеся тем, что липидом-невидимкой является PEG2k-DMG.

[86] Вариантом воплощения 75 изобретения является способ или композиция по любому из предыдущих вариантов воплощения, отличающиеся тем, что композиция дополнительно включает агент, связывающий РНК гид с ДНК.

[87] Вариантом воплощения 76 изобретения является способ или композиция по любому из предыдущих вариантов воплощения, отличающиеся тем, что композиция дополнительно включает мРНК, которая кодирует агент, связывающий РНК гид с ДНК.

[88] Вариантом воплощения 77 изобретения является способ или композиция по вариантам воплощения 75 или 76 изобретения, отличающиеся тем, что агентом, связывающим РНК гид с ДНК, является Cas эндонуклеаза.

[89] Вариантом воплощения 78 изобретения является способ или композиция по варианту воплощения 77 изобретения, отличающиеся тем, что агентом, связывающим РНК гид с ДНК, является Cas9.

[90] Вариантом воплощения 79 изобретения, является способ или композиция по любому из вариантов воплощения 75-78 изобретения, отличающиеся тем, что агент, связывающий РНК гид с ДНК, является модифицированным.

[91] Вариантом воплощения 80 изобретения является способ или композиция по любому из вариантов воплощения 75-79 изобретения, отличающиеся тем, что агентом, связывающим РНК гид с ДНК, является никаза.

[92] Вариантом воплощения 81 изобретения является способ или композиция по вариантам воплощения 79 или 80 изобретения, отличающиеся тем, что модифицированный агент, связывающий РНК гид с ДНК, включает сигнал ядерной локализации (NLS).

[93] Вариантом воплощения 82 изобретения является способ или композиция по любому из вариантов воплощения 75-81 изобретения, отличающиеся тем, что агентом, связывающим РНК гид с ДНК, является каспазой из системы CRISPR/Cas второго типа.

[94] Вариантом воплощения 83 изобретения является способ или композиция по любому из предыдущих вариантов воплощения, отличающиеся тем, что композиция является фармацевтической формой и дополнительно включает фармацевтически приемлемый носитель.

[95] Вариантом воплощения 84 изобретения является способ или композиция по любому из вариантов воплощения 1-5 или вариантов воплощения 8-83 изобретения, отличающиеся тем, что композиция снижает или предотвращает накопление амилоидов или амилоидных фибрилл, включающих TTR.

[96] Вариантом воплощения 85 изобретения является способ или композиция использующие вариант воплощения 84 изобретения, отличающиеся тем, что амилоиды или

амилоидные фибриллы локализованы в нервах, сердце или желудочно-кишечном тракте.

[97] Вариантом воплощения 86 изобретения является способ или композиция по любому из вариантов воплощения 1-5 или вариантов воплощения 8-83, отличающиеся тем, что негомологичное соединение концов (NHEJ), приводит к мутации во время репарации DSB в гене *TTR*.

[98] Вариантом воплощения 87 изобретения является способ или композиция по варианту воплощения 86 изобретения, отличающиеся тем, что NHEJ приводит к делеции или инсерции нуклеотида (ов) во время репарации DSB в гене *TTR*.

[99] Вариантом воплощения 88 изобретения является способ или композиция по варианту воплощения 87 изобретения, отличающиеся тем, что делеции или инсерции нуклеотида (ов) вызывают изменение структуры или нонсенс-мутации в гене *TTR*.

[100] Вариантом воплощения 89 изобретения является способ или композиция по варианту воплощения 87 изобретения, отличающиеся тем, что изменение структуры или нонсенс мутация индуцированы в гене *TTR* по меньшей мере в 50% клеток печени.

[101] Вариантом воплощения 90 изобретения является способ или композиция по варианту воплощения 89 изобретения, отличающиеся тем, что изменение структуры или нонсенс-мутации индуцированы в гене *TTR* 50%-60%, 60%-70%, 70% или 80%, 80%-90%, 90-95%, 95%-99%, или 99%-100% клеток печени.

[102] Вариантом воплощения 91 изобретения является способ или композиция по любому из вариантов воплощения 87-90 изобретения, отличающиеся тем, что количество делеций или инсерций нуклеотидов в гене *TTR* по меньшей мере 50-кратно или превышает такое в нетаргетных сайтах.

[103] Вариантом воплощения 92 изобретения является способ или композиция по варианту воплощения 91 изобретения, отличающиеся тем, что делеции или инсерции нуклеотидов встречаются в гене *TTR* в 50-150 раз, в 150-500 раз, в 500-1500 раз, в 1500-5000 раз, в 5000-15000 раз, в 15000-30 000 раз или в 30000- 60000 раз чаще, по сравнению с нетаргетными сайтами.

[104] Вариантом воплощения 93 изобретения является способ или композиция по любому из вариантов воплощения 87-92 изобретения, отличающиеся тем, что делеции или инсерции нуклеотида (ов) встречаются в менее чем или равном 3, 2, 1, или 0 произвольных нетаргетных сайтах первичных гепатоцитов человека, необязательно отличающихся тем, что нетаргетный сайт (ы) не выявляются в кодирующем регионе белка генома первичных гепатоцитов человека.

[105] Вариантом воплощения 94 изобретения является способ или композиция по варианту воплощения 93 изобретения, отличающиеся тем, что делеции или инсерции нуклеотида (ов) встречаются на многих нетаргетных сайтах в первичных гепатоцитах человека, но составляют меньшее число, чем количество нетаргетных участков, на которых регистрируются делеции или инсерции нуклеотида (ов) в клетках с повышенной экспрессией Cas9, необязательно отличающихся тем, что нетаргетный сайт(ы) не выявляются в кодирующем регионе белка генома первичных гепатоцитов человека.

[106] Вариантом воплощения 95 изобретения является способ или композиция по варианту воплощения 94 изобретения, отличающиеся тем, что клетками с повышенной экспрессией Cas9 являются клетки НЕК293, которые стабильно экспрессируют Cas9.

[107] Вариантом воплощения 96 изобретения является способ или композиция по любому из вариантов воплощения 93-95 изобретения, отличающиеся тем, что количество нетаргетных сайтов в первичных гепатоцитах человека определено анализом геномной ДНК первичных гепатоцитов человека, трансфицированных *in vitro* с мРНК Cas9 и РНК гида, необязательно отличающихся тем, что нетаргетный сайт (ы) не выявляются в кодирующем регионе белка генома первичных гепатоцитов человека.

[108] Вариантом воплощения изобретения 97 является способ или композиция по любому из вариантов воплощения 93-95 изобретения, отличающиеся тем, что количество нетаргетных сайтов в первичных гепатоцитах человека определено в анализе инсерции олигонуклеотидов, включающем анализ геномной ДНК первичных гепатоцитов человека, трансфицированных *in vitro* мРНК Cas9, РНК гида и донорским олигонуклеотидом, необязательно отличающихся тем, что нетаргетный сайт (ы) не выявляются в кодирующем регионе белка генома первичных гепатоцитов человека.

[109] Вариантом воплощения 98 изобретения является способ или композиция по любому из вариантов воплощения 1-43 или вариантов воплощения 47-97 изобретения, отличающиеся тем, что последовательностью РНК гида является:

- 1) SEQ ID №: 92 или 104;
- 2) SEQ ID №: 87, 89, 96, или 113;
- 3) SEQ ID №: 100, 102, 106, 111, или 112; или:

4) SEQ ID №: 88, 90, 91, 93, 94, 95, 97, 101, 103, 108 или 109, необязательно отличающейся тем, что РНК гид не продуцирует делеций/инсерций на нетаргетном(-ых) сайте(-ах), которые встречаются в кодирующем регионе белка генома первичных гепатоцитов человека.

[110] Вариантом воплощения 99 изобретения является способ или композиция по любому из вариантов воплощения 1-5 или вариантов воплощения 8-98 изобретения, отличающиеся тем, что применяемая композиция снижает уровни ТТР у субъекта.

[111] Вариантом воплощения 100 изобретения является способ или композиция по варианту воплощения 99 изобретения, отличающиеся тем, что уровни ТТР снижены по меньшей мере на 50%.

[112] Вариантом воплощения 101 изобретения является способ или композиция по варианту воплощения 100 изобретения, отличающиеся тем, что уровни ТТР снижены на 50%-60%, 60%-70%, 70% или 80%, 80%-90%, 90-95%, 95%-99% или на 99%-100%.

[113] Вариантом воплощения 102 изобретения является способ или композиция использующие варианты воплощения изобретения по м 100 или 101, отличающиеся тем, что уровни ТТР измерены в сыворотке, плазме, крови, спинномозговой жидкости или мокроте.

[114] Вариантом воплощения 103 изобретения является способ или композиция по

вариантам воплощения 100 или 101 изобретения, отличающиеся тем, что уровни TTR измерены в печени, хориоидном сплетении и/или сетчатке.

[115] Вариантом воплощения 104 изобретения является способ или композиция по любому из вариантов воплощения 99-103 изобретения, отличающиеся тем, что уровни TTR измерены с помощью иммуноферментного анализа (ELISA).

[116] Вариантом воплощения 105 изобретения является способ или композиция по любому из вариантов воплощения 1-5 или вариантов воплощения 8-104 изобретения, отличающиеся тем, что у субъекта диагностирован ATTR.

[117] Вариантом воплощения 106 изобретения является способ или композиция по любому из вариантов воплощения 1-5 или вариантов воплощения 8-105 изобретения, отличающиеся тем, что субъектом является человек.

[118] Вариантом воплощения 107 изобретения является способ или композиция по вариантам воплощения 105 или 106 изобретения, отличающиеся тем, что у субъекта определен ATTRwt.

[119] Вариантом воплощения 108 изобретения является способ или композиция по вариантам воплощения 105 или 106 изобретения, отличающиеся тем, что у субъекта диагностирован наследственный ATTR.

[120] Вариантом воплощения 109 изобретения является способ или композиция по любому из вариантов воплощения 1-5, 8-106 или 108 изобретения, отличающиеся тем, что субъект с семейным анамнезом ATTR.

[121] Вариантом воплощения 110 изобретения является способ или композиция по любому из вариантов воплощения 1-5, 8-106 или 108-109 изобретения отличающиеся тем, что у субъекта есть семейная амилоидная полинейропатия.

[122] Вариантом воплощения 111 изобретения является способ или композиция по любому из вариантов воплощения 1-5 или вариантов воплощения 8-110 изобретения, отличающиеся тем, что субъект имеет только или преимущественно неврологические симптомы ATTR.

[123] Вариантом воплощения 112 изобретения является способ или композиция по любому из вариантов воплощения изобретения 1-5 или вариантов воплощения 8-110, отличающиеся тем, что у субъекта есть семейная амилоидная кардиомиопатия.

[124] Вариантом воплощения 113 изобретения является способ или композиция по любому из вариантов воплощения 1-5, 8-109 или 112 изобретения, отличающиеся тем, что субъект имеет только или преимущественно кардиальные симптомы ATTR.

[125] Вариантом воплощения 114 изобретения является способ или композиция по любому из вариантов воплощения 1-5 или вариантов воплощения 8-113 изобретения, отличающиеся тем, что у субъекта экспрессируется TTR с мутацией V30.

[126] Вариантом воплощения 115 изобретения является способ или композиция по варианту воплощения 114 изобретения, отличающиеся тем, что мутациями V30 являются V30A, V30G, V30L или V30M.

[127] Вариантом воплощения 116 изобретения является способ или композиция по

любому из вариантов воплощения 1-5 или вариантов воплощения 8-113 изобретения, отличающиеся тем, что субъект экспрессирует TTR с мутацией T60.

[128] Вариантом воплощения 117 изобретения является способ или композиция по варианту воплощения 116 изобретения, отличающиеся тем, что мутацией T60 является T60A.

[129] Вариантом воплощения 118 изобретения является способ или композиция по любому из вариантов воплощения изобретения 1-5 или вариантов воплощения 8-113 изобретения, отличающиеся тем, что субъект экспрессирует TTR с мутацией V122.

[130] Вариантом воплощения 119 изобретения является способ или композиция по варианту воплощения 118 изобретения, отличающиеся тем, что мутацией V122 является V122A, V122I или V122 (-).

[131] Вариантом воплощения 120 изобретения является способ или композиция по любому из вариантов воплощения 1-5 или вариантов воплощения 8-119 изобретения, отличающиеся тем, что у субъекта экспрессируется «дикий» тип TTR.

[132] Вариантом воплощения 121 изобретения является способ или композиция по любому из вариантов воплощения 1-5, 8-107 или 120 изобретения, отличающиеся тем, что у субъекта не экспрессируется TTR с мутациями V30, T60, или V122.

[133] Вариантом воплощения 122 изобретения является способ или композиция по любому из вариантов воплощения 1-5, 8-107 или 120-121 изобретения, отличающиеся тем, что у субъекта не экспрессируются аномальные мутации TTR.

[134] Вариантом воплощения 123 изобретения является способ или композиция по варианту воплощения 121 изобретения, отличающиеся тем, что субъект является гомозиготным по гену «дикого» типа TTR.

[135] Вариантом воплощения 124 изобретения является способ или композиция по любому из вариантов воплощения 1-5 или вариантов воплощения 8-123 изобретения, отличающиеся тем, что после назначения, у субъекта отмечается выздоровление, стабилизация или замедление изменения в симптомах сенсорно-моторной нейропатии.

[136] Вариантом воплощения 125 изобретения является способ или композиция по варианту воплощения 124 изобретения, отличающиеся тем, что выздоровление, стабилизация или замедление изменения симптомов сенсорной нейропатии зарегистрировано с помощью электромиограммы, тестов на нервную проводимость или результаты сообщены пациентом.

[137] Вариантом воплощения 126 изобретения является способ или композиция по любому из вариантов воплощения 1-5 или вариантов воплощения 8-125 изобретения, отличающиеся тем, что у субъекта отмечается выздоровление, стабилизация или замедление изменения в симптомах застойной сердечной недостаточности.

[138] Вариантом воплощения 127 изобретения является способ или композиция по варианту воплощения 126 изобретения, отличающиеся тем, что выздоровление, стабилизация или замедление изменения в симптомах застойной сердечной недостаточности измерено с использованием биомаркеров на кардиальные тесты, тесты

функции легких, рентгенографии грудной клетки или электрокардиографии.

[139] Вариантом воплощения 128 изобретения является способ или композиция по любому из вариантов воплощения 1-5 или вариантов воплощения 8-127 изобретения, отличающиеся тем, что композиция или фармацевтическая форма доставляются с помощью вирусного вектора.

[140] Вариантом воплощения 129 является способ или композиция по любому из вариантов воплощения 1-5 или вариантов воплощения 8-127 изобретения, отличающиеся тем, что композиция или фармацевтическая форма доставляются с помощью липидных наночастиц.

[141] Вариантом воплощения 130 изобретения является способ или композиция по любому из вариантов воплощения 1-5 или вариантов воплощения 8-129 изобретения, отличающиеся тем, что субъект тестируется на специфические мутации в гене TTR до применения композиции или фармацевтической формы.

[142] Вариантом воплощения 131 изобретения является способ или композиция по любому из вариантов воплощения 1-130 изобретения, отличающиеся тем, что последовательность, которая выбрана из SEQ ID №:5-82, это SEQ ID №: 5.

[143] Вариантом воплощения 132 изобретения является способ или композиция по любому из вариантов воплощения 1-130 изобретения, отличающиеся тем, что последовательность, которая выбрана из SEQ ID №:5-82, это SEQ ID №:6.

[144] Вариантом воплощения 133 изобретения является способ или композиция по любому из вариантов воплощения 1-130 изобретения, отличающиеся тем, что последовательность, которая выбрана из SEQ ID №:5-82, это SEQ ID №:7.

[145] Вариантом воплощения 134 изобретения является способ или композиция по любому из вариантов воплощения 1-130 изобретения, отличающиеся тем, что последовательность, которая выбрана из SEQ ID №:5-82, это SEQ ID №:8.

[146] Вариантом воплощения 135 изобретения является способ или композиция по любому из вариантов воплощения 1-130 изобретения, отличающиеся тем, что последовательность, которая выбрана из SEQ ID №:5-82, это SEQ ID №:9.

[147] Вариантом воплощения 136 изобретения является способ или композиция по любому из вариантов воплощения 1-130 изобретения, отличающиеся тем, что последовательность, которая выбрана из SEQ ID №:5-82, это SEQ ID №:10.

[148] Вариантом воплощения 137 изобретения является способ или композиция по любому из вариантов воплощения 1-130 изобретения, отличающиеся тем, что последовательность, которая выбрана из SEQ ID №:5-82, это SEQ ID №:11.

[149] Вариантом воплощения 138 изобретения является способ или композиция по любому из вариантов воплощения 1-130 изобретения, отличающиеся тем, что последовательность, которая выбрана из SEQ ID №:5-82, это SEQ ID №:12.

[150] Вариантом воплощения 139 изобретения является способ или композиция по любому из вариантов воплощения 1-130 изобретения, отличающиеся тем, что последовательность, которая выбрана из SEQ ID №:5-82, это SEQ ID №:13.

последовательность, которая выбрана из SEQ ID №:5-82, это SEQ ID №:80.

[218] Вариантом воплощения 207 изобретения является способ или композиция по любому из вариантов воплощения 1-130 изобретения, отличающиеся тем, что последовательность, которая выбрана из SEQ ID №:5-82, это SEQ ID №:81.

[219] Вариантом воплощения 208 изобретения является способ или композиция по любому из вариантов воплощения 1-130 изобретения, отличающиеся тем, что последовательность, которая выбрана из SEQ ID №:5-82, это SEQ ID №:82.

[220] Вариантом воплощения 209 изобретения является использование композиции или состава по любому варианту из пунктов 6-208 воплощения изобретения для подготовки препарата для лечения субъекта человека с АТТР.

[221] Также раскрыто использование композиции или состава по любому из предшествующих вариантов воплощения для подготовки препарата для лечения субъекта человека с АТТР. Также раскрыт любой из предшествующих составов или композиций для использования при лечении АТТР или для использования при модификации (например, формирование инсерций/делеций в, или формирование сдвига рамки считывания или нонсенс мутации) гена *TTR*.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

[222] ФИГ.1 схематически представляет хромосому 18 с регионами гена *TTR*, которые являются таргетными для последовательностей гена, предоставленных в Таблице 1.

[223] ФИГ.2 представляет нетаргетный анализ в клетках HEK293_Cas9 определенных двухцепочечных РНК гена, предназначенных для *TTR*. Таргетный сайт обозначен заштрихованным квадратом для каждой тестируемой двухцепочечной РНК гена, тогда как заштрихованные круги представляют потенциальный нетаргетный сайт.

[224] ФИГ.3 представляет нетаргетный анализ в клетках HEK_Cas9 определенных одноцепочечных РНК гена, предназначенных для *TTR*. Таргетный сайт обозначен заштрихованным квадратом для каждой тестируемой одноцепочечной РНК гена, тогда как заштрихованные круги представляют потенциальный нетаргетный сайт.

[225] ФИГ.4 представляет кривые зависимости доза-ответ наночастиц липида, сформированных с *TTR* специфическими sgRNAs человека в первичных гепатоцитах человека.

[226] ФИГ.5 представляет кривые зависимости доза-ответ наночастиц липида, сформированных с *TTR* специфическими sgRNAs человека в первичных гепатоцитах обезьяны.

[227] ФИГ.6 представляет кривые зависимости доза-ответ наночастиц липида, сформированных с *TTR* специфическими sgRNAs обезьяны в первичных гепатоцитах обезьяны.

[228] ФИГ.7 представляет процент редактирования (редактированный %) *TTR* и снижение секретируемого *TTR* после введения последовательности гена в клетки HUH7, предоставленные на оси X. Значения нормированы по количеству белка альфа-1-

антитрипсина (ААТ).

[229] На ФИГ.8 представлен анализ внутриклеточного ТТР методом вестерн-блоттинга в клетках НУН 7 после введения таргетных гидов (перечисленных в Таблице 1).

[230] На ФИГ.9 представлено процент редактирования ТТР в печени, наблюдаемый после введения составов LNP мышам с гуманизированным (G481-G499) или мышинным (G282) ТТР. Примечание: первые три значения «0» для ID каждого гида не представлены на графике, например «G481» это «G000481» в Таблицах 2 и 3.

[231] На ФИГ.10А-В представлены уровни ТТР в сыворотке, наблюдаемые после режимов дозирования, указанных на горизонтальной оси как мкг/мл (ФИГ.10А) или как процент от контроля TSS (ФИГ.10В). МРК=мг/кг для всех значений.

[232] На ФИГ.11А-В представлены уровни ТТР в сыворотке, наблюдаемые после режимов дозирования, указанных на горизонтальной оси для 1 мг/кг (ФИГ.11А) или дозировки 0.5 мг/кг (ФИГ.11В). Данные для одной дозы 2 мг/кг представлены в правой колонке для обеих групп.

[233] На ФИГ.12А-В представлено процент редактирования ТТР в печени, наблюдаемый после режимов дозирования, указанных на горизонтальной оси для 1 мг/кг (ФИГ.12А) или дозировки 0.5 мг/кг (ФИГ.12В). На ФИГ.12С представлен процент редактирования в печени, наблюдаемый после одной дозы 0,5, 1, или 2 мг/кг.

[234] На ФИГ.13 представлено процент редактирования ТТР в печени, наблюдаемый после введения составов LNP мышам с гуманизированным геном ТТР. Примечание: первые три значения «0» для ID каждого гида не представлены на графике, например «G481»-«G000481» в Таблицах 2 и 3.

[235] На ФИГ. 14 А-В представлена корреляция между уровнями редактирования ТТР в печени (ФИГ.14А) и в сыворотке человека (ФИГ.14В) после введения составов LNP мышам с гуманизированным геном ТТР. Примечание: первые три значения «0» для ID каждого гида не представлены на графике, например «G481»-«G000481» в Таблицах 2 и 3.

[236] На ФИГ.15А-В представлены кривые зависимости доза-ответ в процентах редактирования (ФИГ.15А) и уровни ТТР в сыворотке (ФИГ.15В) у мышей «дикого» типа после введения им составов LNP, включающих гид G502, который является перекрестно гомологичным между мышью и обезьяной.

[237] На ФИГ.16 представлены кривые зависимости доза-ответ наночастиц липида, сформированных из специфических sgRNAs ТТР человека в первичных гепатоцитах обезьяны.

[238] На ФИГ.17 представлены кривые зависимости доза-ответ наночастиц липида, сформированных из специфических sgRNAs ТТР обезьяны в первичных гепатоцитах человека.

[239] На ФИГ.18 представлены кривые зависимости доза-ответ наночастиц липида, сформированных из специфических sgRNAs ТТР обезьяны в первичных гепатоцитах обезьяны.

[240] На ФИГ.19 А-Д представлены уровни ТТР в сыворотке (% от TSS; ФИГ.19А и

19C) и результаты редактирования после дозирования составов LNP при указанных соотношениях и количестве (ФИГ.19В И 19D).

[241] На ФИГ. 20 представлен нетаргетный анализ специфических одноцепочечных РНК генов, таргетирующих TTR в первичных гепатоцитах человека (PHH). На графике заполненные квадраты представляют идентифицированный таргетный сайт, а незалитые круги представляют потенциальные нетаргетные сайты.

[242] На ФИГ. 21 А - В представлен процент таргетного редактирования (ONT, ФИГ.21 А) и два нетаргетных сайта (OT2 и OT4) в первичных гепатоцитах человека после внесения составов наночастиц липида сформированных с G000480. На ФИГ. 21 В - повторно масштабируемая версия OT2, OT4 и на ФИГ.21 А результаты отрицательного контроля.

[243] На ФИГ. 22 А-В представлен процент таргетного редактирования (ONT, ФИГ.22 А) и на нетаргетном сайте (OT4) в первичных гепатоцитах человека после внесения составов наночастиц липида сформированных с G000486. На ФИГ. 22 В - повторно масштабируемая версия OT4 и результаты отрицательного контроля на ФИГ.22 А.

[244] На ФИГ. 23А-В представлен процент редактирования (ФИГ.23 А) и количество событий инсерций и делеций в локусе TTR (ФИГ.23В). На ФИГ. 23 А представлен процент редактирования в локусе TTR для контрольных и обработанных групп (наночастицами липида сформированными со специфическими sgRNA TTR). На ФИГ. 23 В представлено количество событий инсерций и делеций в локусе TTR, когда редактирование наблюдалось в обработанной группе - ФИГ.23А.

[245] На ФИГ 24А-В представлены уровни циркулирующего TTR в сыворотке (ФИГ.24 А) и спинномозговой жидкости (CSF) (ФИГ.24В), в мкг/мл, соответственно, для контрольных и обработанных групп (наночастицами липида сформированными со специфическими sgRNA TTR). Обработка приводила к более 99% ингибированию уровней TTR в сыворотке.

[246] На ФИГ. 25А-Д представлены результаты иммуногистохимического окрашивания TTR в желудке (ФИГ.25А), толстой кишке (ФИГ. 25В), седалищном нерве (ФИГ. 25С), и ганглиях дорсального корешка (DRG) (ФИГ. 25D) для контрольных и обработанных мышей (наночастицами липида сформированными со специфическими sgRNA TTR). В гистограммах справа представлено снижение окрашивания TTR через 8 недель после обработки мышей, в процентах для ткани каждого типа.

[247] На ФИГ.26А-С представлено редактирование TTR в печени (ФИГ.26А) и результаты TTR в сыворотке (в мкг/мл (ФИГ.26В) и как процент от контроля с TSS (ФИГ.26С), соответственно, для мышей с гуманизированным TTR, обработанных составами в диапазоне доз LNP с генами G000480, G000488, G000489 и G000502, и содержащих мРНК Cas9 (SEQ ID №: 1) в соотношении 1:1 к массе гена.

[248] На ФИГ.27А-С представлено редактирование TTR в печени (ФИГ.27 А) и результаты TTR в сыворотке (в мкг/мл (ФИГ.27 В)) и как процент от контроля с TSS контроля (ФИГ.27 С), соответственно, для мышей с гуманизированным TTR, мышей,

обработанных составами в диапазоне доз LNP с гидами G000481, G000482, G000486 и G000499, и содержащих мРНК Cas9 (SEQ ID №: 1) в соотношении 1:1, к массе гида.

[249] На ФИГ.28А-С представлено редактирование TTR в печени (ФИГ.28 А) и результаты TTR в сыворотке (в мкг/мл (ФИГ.28 В)) и как процент от контроля с TSS (ФИГ.28 С), соответственно, для мышей с гуманизированным TTR, обработанных составами в диапазоне доз LNP с гидами G000480, G000481, G000486, G000499 и G000502, и содержащих мРНК Cas9 (SEQ ID №: 1) в соотношении 1:2, к массе гида.

[250] На ФИГ.29 представлена относительная экспрессия мРНК TTR в первичных гепатоцитах человека (РНН) после их обработки LNP с включенными мРНК Cas9 и gRNA как указано, по сравнению с отрицательными (не обработанными) контролями.

[251] На ФИГ.30 представлена относительная экспрессия мРНК TTR в первичных гепатоцитах человека (РНН) после их обработки LNP с включенными мРНК Cas9 и gRNA как указано, по сравнению с отрицательными (не обработанными) контролями.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[252] Теперь подробно будут приведены ссылки на некоторые варианты воплощения изобретения, примеры которых иллюстрируются в сопроводительных чертежах. Хотя изобретение будет описано в сочетании с проиллюстрированными вариантами воплощения изобретения, подразумевается, что они не предназначены для ограничения изобретения этими вариантами воплощения. Напротив, изобретение предназначено для охвата всех альтернативных, модифицированных и эквивалентных вариантов, которые могут быть включены в изобретение, как это определено в прилагаемой формуле изобретения.

[253] Перед подробным представлением идей настоящего изобретения следует понимать, что раскрытие не ограничивается конкретными композициями или этапами процесса, поскольку таковые могут варьироваться. Следует отметить, что, в этом описании и прилагаемой формуле изобретения, форма в единственном числе включает ссылки множественного числа, за исключением случаев, когда из контекста явно следует другое. Так, например, ссылка на «конъюгат» включает множество конъюгатов, а ссылка на «клетку» включает множество клеток и т.п.

[254] Числовые диапазоны включают в себя числа, определяющие диапазон. Измеренные и измеряемые значения понимаются как приблизительные, с учетом значимости цифр и ошибки, связанной с измерением.

Кроме того, использование определений, «состоять из», «состоит из», «состоящий из», «содержать», «содержит», «содержащий», «включать», «включает», «включающий», не подразумевают ограничения. Следует понимать, что как предшествующее общее описание и подробное описание являются только образцовыми и пояснительными, а не ограничительными требованиями.

[255] Если специально не отмечено в вышеупомянутом описании, варианты воплощения изобретения в описании, которые декларируют «включение» различных компонентов, также рассматриваются как «состоящий из» или «состоящий в основном из» декларированных компонентов; варианты воплощения изобретения в описании, в которых

декларируются «состоящие из» различных компонентов, также рассматриваются как «включающие» или «состоящие в основном из», декларируемые компоненты и варианты воплощения изобретения в описании, которые декларируют «состоящие в основном из» различных компонентов, также рассматриваются как «состоящие из», или «включающие» декларируемые компоненты (эта взаимозаменяемость не относится к использованию этих терминов в формуле изобретения). Термин «или» используется в инклюзивном смысле, то есть, эквивалентен «и/или», если только контекст явно не указывает на обратное.

[256] Заголовки раздела, используемые в настоящем документе, предназначены только для организационных целей и не должны рассматриваться как ограничивающие желаемый предмет каким-либо образом. В случае, если любой материал, включенный посредством ссылки, противоречит любому термину, определенному в данном описании, или любому другому экспресс-контенту этого описания, это контролируется описанием. Хотя настоящее представление описывается в сочетании с различными вариантами воплощения, не предполагается, что предлагаемые идеи будут ограничиваться такими вариантами воплощения. Напротив, предлагаемые идеи охватывают различные альтернативы, модификации и эквиваленты, согласно современным новейшим представлениям.

6. Определения

[257] Если не заявлено иначе, то используемые здесь термины и фразы должны иметь следующие значения:

[258] «Полинуклеотид» и «нуклеиновая кислота» используются в данном документе для обозначения многомерного соединения, включающего нуклеозиды или нуклеозидные аналоги, которые имеют азотистые гетероциклические основания или базовые аналоги, соединенные вместе вдоль остова, включая обычную РНК, ДНК, смешанную РНК-ДНК и полимеры, которые являются их аналогами. «Остов» нуклеиновой кислоты может содержать различные связи, в том числе одну или более сахар-фосфодиэфирных связей, связи пептид-нуклеиновой кислоты («пептид-нуклеиновые кислоты» или PNA, РСТ № WO 95/32305), фосфоротионатные связи, метилфосфонатные связи, или их комбинации. Остатки сахара нуклеиновой кислоты могут быть рибозой, дезоксирибозой, или подобными формами с заменами, например, 2'' метокси- или 2'' галидными заменами. Азотистые основания могут быть обычными основаниями (A, G, C, T, U), их аналогами (например, модифицированные уридины, такие как 5-метоксиуридин, псевдоуридин, или N1-метилпсевдоуридин, или другие); инозин; производные пуринов или пиримидинов (например, дезоксигуанозин N⁴-метил, деаза- или аза-пурины, деаза- или аза-пиримидины, пиримидиновые основания с заменяемыми группами в 5 или 6 положениях (например, 5-метилцитозин), пуриновые основания с заменой во 2, 6, или 8 положениях, 2-амино-6-метиламинопуридин, O⁶-метилгуанин, 4-тио-пиримидины, 4-амино- пиримидины, 4-диметилгидразин-пиримидины и O⁴-алкил-пиримидины, США, патент №5 378 825 и РСТ № WO 93/13121). Для общего обсуждения см. *Биохимию нуклеиновых кислот (The Biochemistry of the Nucleic Acids* 5-36, Adams et al., ed., 11th ed., 1992). Нуклеиновые кислоты

могут включать один или более «абазических» остатков, когда остов не содержит азотистого основания для положения (й) полимера (Патент США. № 5 585 481). Нуклеиновая кислота может включать только известные сахара, основания и связи с РНК или с ДНК, основы и связи, или как известные компоненты так и замены (например, известные основания с 2' метокси- связями, или полимеры, содержащие известные основания и один или более аналогов оснований). Нуклеиновая кислота включает «закрытую нуклеиновую кислоту» (LNA), аналог, содержащий один или более мономеров нуклеотида LNA с бициклической единицей фуранозы, закрытой в РНК, которая мимикрирует углеводную конформацию и повышает сродство гибридизации к комплементарной РНК и последовательностям ДНК ((Vester and Wengel, 2004, *Biochemistry* 43(42): 13233-41). РНК и ДНК имеют различные сахарные остатки и могут отличаться наличием урацила или его аналогов в РНК, и тимина или его аналогов в ДНК.

[259] Термины «РНК гид», «gRNA» и «проводник» используются в контексте данного документа взаимозаменяемо и относятся или к crRNA (также известной как РНК CRISPR), или к комбинации crRNA и trRNA (также известной как tracrRNA). crRNA и trRNA могут быть связаны как с одноцепочечной молекулой РНК (одноцепочечная РНК гид, sgRNA) или с двумя отдельными молекулами РНК (двухцепочечная РНК гид, dgRNA). «РНК гид» или «gRNA» относятся к каждому ряду. trRNA может быть естественно встречающейся последовательностью, или trRNA последовательностью с модификациями или вариациями, по сравнению с естественно встречающимися последовательностями.

[260] В контексте данного документа, термин «последовательность гида» обращен к последовательности РНК гида, которая комплементарна к таргетной последовательности и функционирует для ориентации РНК гида к таргетной последовательности для связывания или модификации (например, сегментации) агента, связывающего РНК гид с ДНК. «Последовательность гида» может также упоминаться как «таргетная последовательность», или «спейсерная последовательность». «Последовательность гида» может быть длиной 20 пар оснований, например, в случае *Streptococcus pyogenes* (то есть, Spy Cas9) и связанные с ней гомологичные/ортологичные Cas9. Более короткие или более длинные последовательности могут также использоваться как гиды, например, длиной 15-, 16-, 17-, 18-, 19-, 21-, 22-, 23-, 24, или 25 нуклеотидов. Например, в некоторых вариантах воплощения изобретения, последовательность гида включает по меньшей мере 17, 18, 19, или 20 смежных последовательностей нуклеотидов, выбранных из SEQ ID №:5-82. В некоторых вариантах воплощения изобретения таргетная последовательность локализована, например, в гене или на хромосоме, и комплементарна к последовательности гида. В некоторых вариантах воплощения изобретения степень взаимозависимости или идентичности между последовательностью гида и ее соответствующей таргетной последовательностью может составлять, приблизительно, 75, 80, 85, 88, 90, 95, 96, 97, 98, 99% или 100%. Например, в некоторых вариантах воплощения изобретения, последовательность гида включает последовательность приблизительно с 75, 80, 85, 88, 90, 95, 96, 97, 98, 99% или 100% идентичностью к по меньшей мере 17, 18, 19, или 20

последовательностям смежных нуклеотидов, выбранных из SEQ ID №:5-82. В некоторых вариантах воплощения изобретения последовательность гида и таргетный участок могут быть на 100% комплементарными или идентичными. В других вариантах воплощения изобретения последовательность гида и таргетный участок могут содержать по меньшей мере одно несоответствие. Например, последовательность гида и таргетная последовательность могут содержать 1, 2, 3, или 4 несоответствия, где общая длина таргетной последовательности составляет по меньшей мере 17, 18, 19, 20 или больше пар оснований. В некоторых вариантах воплощения изобретения последовательность гида и таргетный участок могут содержать 1-4 несоответствия, когда последовательность гида включает по меньшей мере 17, 18, 19, 20 или более нуклеотидов. В некоторых вариантах воплощения изобретения последовательность гида и таргетный участок могут содержать 1, 2, 3, или 4 несоответствия, где последовательность гида включает 20 нуклеотидов.

[261] Таргетные последовательности для Cas белков включают положительные и отрицательные нити геномной ДНК (то есть, данная последовательность и обратная комплементарная последовательность), так как субстратом нуклеиновой кислоты для Cas является двухцепочечная нуклеиновая кислота. Соответственно, когда последовательность гида, как говорят, «комплементарна к таргетной последовательности», предполагается, что последовательность гида может ориентировать РНК гид для связи с обратной комплементарной таргетной последовательностью. Таким образом, в некоторых вариантах воплощения изобретения, где последовательность гида связывается с обратной комплементарной таргетной последовательностью, последовательность гида идентична определенным нуклеотидам таргетной последовательности (например, таргетная последовательность, не включает РАМ) за исключением замены U на T в последовательности гида.

[262] В контексте данного документа, под термином «агент, связывающий РНК гид с ДНК» подразумевается полипептид или комплекс полипептидов, обладающих активностью по связыванию с РНК и ДНК, или субъединица этого комплекса, связывающаяся с ДНК, отличающаяся тем, что ДНК связывающая активность является специфической для последовательности и зависит от последовательности РНК. Иллюстративные «агенты, связывающие РНК гид с ДНК» включают расщепленные эндонуклеазой/никазой Cas белки и их инактивированные формы («dCas агенты, связывающиеся с ДНК»). Cas нуклеаза, также называемая «Cas белком» в контексте данного документа, охватывает Cas эндонуклеазы, Cas никазы и агент, связывающий dCas с ДНК. Расщепленные белки и агент, связывающий dCas с ДНК, включают Csm или комплекс Cmr типа III система CRISPR, Cas 10, Csm 1, или его субъединицу Cmr 2, каскадный комплекс типа I системы CRISPR, или ее субъединицу Cas3, и нуклеазы Cas Класса 2. В контексте данного документа, «нуклеазой Cas Класса 2» являются одноцепочечные полипептиды с активностью, связывания РНК с ДНК, такие как Cas 9 нуклеаза или Cpf 1 нуклеаза. Нуклеазы Cas Класса 2 включают рестриктазы Класса 2 и Cas никазы Класса 2 (например, варианты H840A, D10A, или N863A), которые дополнительно

обладают активностью рестриктазы и эндонуклеазы относительно РНК и ДНК, и активностью агента, связывающего dCas Класса 2 с ДНК, в котором инактивирована активность рестриктазы/никазы. Нуклеазы Cas класса 2 включают, например, Cas9, Cpf1, C2c1, C2c2, C2c3, HF Cas 9 (например, варианты N497A, R661A, Q695A, Q926A), НураCas9 (например, варианты N692A, M694A, Q695A, H698A), eSPCas9 (1.0), (например, варианты K810A, K1003A, R1060A), и eSPCas 9 (1.1), (например, варианты K848A, K1003A, R1060A) белки и их модификации. Белок Cpf1 (Zetsche et al., *Cell*, 163: 1-13 (2015)), является гомологичным к Cas9, и содержит RuvC-подобный домен нуклеазы. Последовательности Cpf1 Zetsche включены полностью посредством ссылки. См., например, Zetsche, Таблицы S1 и S3. «Cas9» охватывает Spy Cas9, варианты Cas9, перечисленного здесь, и их эквиваленты. См., например, Makarova et al., *Nat Rev Microbiol*, 13(11): 722-36 (2015); Shmakov et al., *Molecular Cell*, 60:385-397 (2015).

[263] Термин «модифицированный уридин» используется в этом документе для ссылки на нуклеозид кроме тимидина с одинаковыми акцепторами связывания водорода, что и у уридина, и одним или более структурных отличий от уридина. В некоторых вариантах воплощения изобретения модифицированный уридин является субъединицей уридина, то есть, представлен уридином, в котором одна или более непротонированных замещаемых групп (например, алкокси-, например, метокси-) занимают место протона. В некоторых вариантах воплощения изобретения модифицированный уридин является псевдоуридином. В некоторых вариантах воплощения изобретения модифицированный уридин является замененным псевдоуридином, т.е. псевдоуридином, в котором одна или более непротонированных замещающих групп (например, алкил-, например, метил-) занимают место протона. В некоторых вариантах воплощения изобретения модифицированным уридином является любой из следующего: замененный уридин, псевдоуридин, или замененный псевдоуридин.

[264] В контексте данного документа термин «положение уридина» относится к положению в полинуклеотиде, занятом уридином или модифицированным уридином. Таким образом, например, полинуклеотид, в котором «100% положений уридина являются модифицированными уридинами», содержит модифицированный уридин в каждом положении, в котором бы уридин локализовался в обычной последовательности РНК (где все основания являются стандартными основаниями А, U, С или G). Если не определено иначе, то U в полинуклеотидной последовательности в таблице или в перечне последовательностей, или в раскрытии этого изобретения может быть уридином или модифицированным уридином.

[265] В контексте данного документа, предполагается, что первая последовательность «включает последовательность с идентичностью на по меньшей мере X% к» второй последовательности, если сравнительный анализ первичной структуры первой последовательности ко второй последовательности демонстрирует, что X% или больше положений второй последовательности полностью комплементарны первой последовательности. Например, последовательность, AAGA включает последовательность

со 100% комплементарностью к последовательности AAG если при сравнительном анализе продемонстрирована 100% идентичность ко всем парам трех положений второй последовательности. Различия между РНК и ДНК (обычно замена уридина на тимидин или наоборот) и наличие аналогов нуклеозида, таких как модифицированные уридины, не влияют на разницу в идентичности или взаимозависимости среди полинуклеотидов, пока у соответствующих нуклеотидов (таких как тимидин, уридин, или модифицированный уридин) сохраняется комплементарность (например, аденозин для всех из: тимидина, уридина, или модифицированного уридина; другим примером является цитозин и 5-метилцитозин, оба из которых комплементарны гуанозину или модифицированному гуанозину). Таким образом, например, последовательность 5'-AXG, где X является любым модифицированным уридином, таким как псевдоуридин, N1-метил псевдоуридин, или 5-метоксиуридин, считаются 100% идентичными к AUG, потому что оба полностью комплементарны к той же самой последовательности (5'-CAU). Иллюстративными алгоритмами сравнительного анализа являются общепринятые алгоритмы Smith-Waterman и Needleman-Wunsch. Для специалиста в рассматриваемой области техники понятен выбор алгоритма и адекватных параметров выбора данной пары последовательностей, чтобы при сравнительном анализе первичной структуры последовательностей получить последовательности в целом близкой длины и ожидаемой идентичности более 50% для аминокислот или более 75% для нуклеотидов. Алгоритм Needleman-Wunsch с параметрами настройки интерфейса алгоритма Needleman-Wunsch по умолчанию предоставлены на сервере EBI в www.ebi.ac.uk и в целом являются применимыми.

[266] В контексте данного документа термин «мРНК, матричная РНК» ссылается на полинуклеотид, который не является ДНК и включает открытую рамку для считывания, которая потенциально может быть транслирована в полипептидную цепь (то есть, может служить субстратом для трансляции на рибосоме и аминокислотирования транспортной РНК (тРНК)). мРНК может включать сахарофосфатный остов остатков рибозы или их аналогов, например, 2'-метокси-остатки рибозы. В некоторых вариантах воплощения изобретения сахарофосфатный остов мРНК состоит по существу из остатков рибозы, 2'-метокси-остатков рибозы, или их комбинации. В общем, мРНК не содержат значительных количеств остатков тимидина (например, 0 остатков или меньше чем 30, 20, 10, 5, 4, 3, или 2 остатка тимидина; или содержание тимидина меньше чем 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1, 0,5, 0,2% или на 0,1%). мРНК может содержать модифицированные уридины в некоторых или во всех положениях уридина.

[267] В контексте данного документа термин «минимальное содержание уридина» представленной открытой рамки для считывания (ORF) является содержанием уридина в ORF, что (а) использует минимальный кодон уридина в каждом положении, и (б) кодирует ту же самую аминокислотную последовательность, что и представленная ORF. Минимальный кодон (ы) уридина для данной аминокислоты является кодоном (ами) с наименьшим количеством уридинов (обычно 0 или 1 за исключением кодона для фенилаланина, где минимальный кодон для уридина содержит 2 уридина).

Модифицированные остатки уридина принимаются как эквивалентные уридинам при оценке минимального содержания уридина.

[268] В контексте данного документа термин «минимальное содержание динуклеотида уридина» представленной открытой рамки для считывания (ORF) является самым низким содержанием динуклеотида уридина (UU) в ORF, что (a) использует минимальный кодон уридина (как обсуждено выше) в каждом положении, и (b) кодирует ту же самую аминокислотную последовательность, что и представленная ORF. Содержание динуклеотида уридина (UU) может быть выражено в абсолютных терминах как перечисление динуклеотидов UU в ORF или как уровень оснований в процентах от положений, занятых уридинами и динуклеотидов уридина (например, у AUUUAU содержание динуклеотидов уридина может составлять 40%, потому что 2 из 5 положений заняты уридинами и динуклеотидов уридина). Модифицированные остатки уридина принимаются как эквивалентные уридинам при оценке минимального содержания динуклеотидов уридина.

[269] В контексте данного документа термин «TTR» относится к транстиретиону, который является продуктом гена *TTR*.

[270] В контексте данного документа термин «амилоид» относится к аномальной агрегации белков или пептидов, которые обычно растворимы. Амилоиды являются нерастворимыми и могут образовывать белковые осадки в органах и тканях. Белки или пептиды в амилоидах могут изменять конформацию в форму, которая позволяет многим копиям белка склеиваться с образованием фибрилл. В то время как некоторые формы амилоида могут поддерживать нормальные функции в организме человека, термин «амилоиды» в контексте данного документа обращен к аномальной или патологической агрегации белка. Амилоиды могут включать один белок или пептид, такой как TTR, или они могут включать несколько белков или пептидов, таких как TTR и дополнительные белки.

[271] В контексте данного документа термин «амилоидные фибриллы» обращен к нерастворимым волокнам амилоида, которые устойчивы к деградации. Амилоидные фибриллы могут вызывать симптомы, связанные со специфическими белками или пептидами и функцией ткани и клетки, в которых они агрегировали.

[272] В контексте данного документа термин «амилоидоз» обращен к заболеванию с характерными симптомами, вызванными депонированием амилоидов или амилоидных фибрилл. Амилоидоз может поражать многие органы, включая сердце, почки, печень, селезенку, нервную систему и пищеварительный тракт.

[273] В контексте данного документа термины «ATTR», «TTR-связанный амилоидоз», «амилоидоз TTR», «амилоидоз ATTR» или «амилоидоз, ассоциированный с TTR», относятся к амилоидозу, который обусловлен депонированием TTR.

[274] В контексте данного документа термин «семейная амилоидная кардиомиопатия» или «FAC» относится к наследственному транстиретиновому амилоидозу (ATTR), который, прежде всего, характеризуется рестриктивной кардиомиопатией.

Застойная сердечная недостаточность распространена при FAS. Средний возраст начала заболевания приблизительно 60-70 лет, с предполагаемой продолжительностью жизни 4-5 лет после постановки диагноза.

[275] В контексте данного документа термин «семейная амилоидная полинейропатия» или «FAP» обращен к наследственному транстиретиновому амилоидозу (ATTR), который, прежде всего, характеризуется сенсорно-двигательной нейропатией. Автономная нейропатия распространена при FAP. Несмотря на то, что нейропатия является первичной характеристикой, симптомы FAP могут также включать кахексию, почечную недостаточность и кардиологические заболевания. Средний возраст начала FAP составляет приблизительно 30-50 лет, с предполагаемой продолжительностью жизни 5-15 лет после постановки диагноза.

[276] В контексте данного документа «дикий тип ATTR» и «ATTRwt» относится к ATTR, который не связан с аномальными мутациями TTR, такими как T60A, V30M, V30A, V30G, V30L, V122I, V122A, или V122 (-). ATTRwt также упоминался как старческий системный амилоидоз. Начало типично встречается у мужчин в возрасте 60 или старше, наиболее общими симптомами являются застойная сердечная недостаточность и патологический сердечный ритм, такой как фибрилляция предсердий. Дополнительные симптомы включают последствия нарушения сердечной функции, такие как одышка, усталость, головокружение, отек (особенно в ногах), тошнота, стенокардия, бессонница и потеря в весе. Туннельный синдром запястья в анамнезе указывает на повышенный риск для ATTRwt и может в некоторых случаях указывать на заболевание в более раннем возрасте. Как правило, ATTRwt приводит к ухудшению сердечной функции в течение длительного времени, но может иметь лучший прогноз, по сравнению с наследственным ATTR, потому что агрегаты «дикого» типа TTR накапливаются более медленно. Существующее лечение подобно другим формам ATTR (кроме трансплантации печени) и в общем направлено на поддержку или улучшение сердечной функции, включая диуретики, ограничение в приеме жидкости и соли, введение антикоагулянтов, и в тяжелых случаях, трансплантация сердца. Тем не менее, как и FAS, ATTRwt может привести к фатальным последствиям вследствие сердечной недостаточности, иногда в течение 3-5 лет после постановки диагноза.

[277] Последовательности гена, полезные для композиций гена РНК и способы, описанные в этом документе, представлены в Таблице 1 и по ходу изложения заявки.

[278] В контексте данного документа термин «наследственный ATTR» относится к ATTR, который связан с мутацией в последовательности гена *TTR*. Известные мутации в гене *TTR*, ассоциированные с ATTR, включают TTR с заменами T60A, V30M, V30A, V30G, V30L, V122I, V122A или V122 (-).

[279] В контексте данного документа термин «инсерция-делеция» относится к мутациям инсерция/делеция, состоящим из нескольких полинуклеотидов, которые или вставлены или удалены на участке двухспиральных разрывов (DSBs) в таргетной нуклеиновой кислоте.

[280] В контексте данного документа термин «нокдаун» обращен к снижению экспрессии специфического генного продукта (например, белка, мРНК, или обоих). Нокдаун может быть измерен по белку или по выявлению белка, секретлируемого тканью или группой клеток (например, в сыворотке или питательных средах растущих клеток) или при определении общего количества белка в ткани или клеточной популяции, представляющей интерес. Способы измерения нокдауна мРНК известны и включают секвенирование мРНК, выделенной из ткани или популяции исследуемых клеток. В некоторых вариантах воплощения изобретениях термин «нокдаун» может относиться к некоторому снижению экспрессии специфического генного продукта, например, к снижению количества транскрибированной мРНК или к снижению количества белка, экспрессируемого или секретлируемого популяцией клеток (включая группы *in vivo*, в которых он определяется в тканях).

[281] В контексте данного документа термин «нокаут» обращен к снижению экспрессии специфического белка в клетке. Нокаут может быть измерен по выявлению количества белка, секретлируемого тканью или группой клеток (например, в сыворотке или питательных средах растущих клеток) или при определении общего количества белка в ткани или клеточной популяции. В некоторых вариантах воплощения изобретения раскрывается «нокаут» TTR в одной или более клеток (например, в популяции клеток, включая группы *in vivo*, в которых он определяется в тканях). В некоторых вариантах воплощения изобретениях нокаут не формируется мутантным белком TTR, например, вызван делецией/инсерцией, но чаще всего обусловлен полной потерей экспрессии белка TTR в клетке.

[282] В контексте данного документа, термин «мутантный TTR» обращен к продукту *TTR* гена (то есть, к белку TTR), у которого присутствуют модификации в последовательности аминокислоты TTR по сравнению с последовательностью аминокислоты TTR «дикого типа». Последовательность «дикого типа» TTR человека доступна на NCBI Gene ID: 7276; Ensembl: Ensembl: ENSG00000118271. Формы мутантного TTR, ассоциированного с ATTR, например, у человека, включают T60A, V30M, V30A, V30G, V30L, V122I, V122A или V122 (-).

[283] В контексте данного документа термины «мутантный *TTR*» или «мутантный аллель *TTR*» обращены к последовательности *TTR*, у которой присутствуют модификации в нуклеотидной последовательности TTR по сравнению с последовательностью TTR «дикого типа». (NCB Gene ID: 7276; Ensembl: ENSG00000118271).

[284] В контексте данного документа термины «рибонуклеотид» (RNP) или «RNP комплекс» обращены к РНК гида вместе с агентом, связывающим РНК-гид с ДНК, например, нуклеазой Cas, Cas рестриктазой, Cas никазой или агентом, связывающим dCas с ДНК (например, Cas9). В некоторых вариантах воплощения изобретения РНК гид ориентирует агент, связывающий РНК с ДНК, такой как Cas9, к таргетной последовательности, и РНК гида гибридизируется с агентом связывания с таргетной последовательностью; в случаях, когда агент является рестриктазой или никазой,

связывание может сопровождаться последующим расщеплением или удалением.

[285] В контексте данного документа термин «таргетная последовательность» обращается к последовательности нуклеиновой кислоты в таргетном гене, который комплементарен последовательности гида gRNA. Взаимодействие таргетной последовательности и последовательности гида ориентирует агент, связывающий РНК гид к ДНК, для связывания и потенциального вырезания или расщепления (в зависимости от активности агента), в пределах таргетной последовательности.

[286] В контексте данного документа термин «лечение» обращается к любому назначению или применению препарата при заболевании или нарушении субъекту, и включает ингибирование заболевания, купирование его развития, облегчения одного или более симптомов заболевания, излечение болезни, или предотвращение рецидива одного или более симптомов заболевания. Например, лечение ATTR может включать облегчение симптоматики ATTR.

[287] Термин «модифицированный уридин» используется в этом документе для ссылки на нуклеозид кроме тимидина с одинаковыми акцепторами связывания водорода, что и у уридина, с одним или более структурными отличиями от уридина. В некоторых вариантах воплощения изобретения модифицированный уридин является замещенным уридином, то есть, представлен уридином, в котором одна или более протонированных замещающих групп (например, алкокси- или метокси-) занимают место протона. В некоторых вариантах воплощения изобретения, модифицированный уридин является псевдоуридином. В некоторых вариантах воплощения изобретения модифицированный уридин является замененным псевдоуридином, в котором одна или более протонированных замещающих групп (например, алкил-, например, метил-) занимают место протона, например, псевдоуридин N1-метил. В некоторых вариантах воплощения изобретения модифицированным уридином является любой замененный уридин, псевдоуридин, или замененный псевдоуридин.

[288] В контексте данного документа первая последовательность, как считается, «включает последовательность с идентичностью на по меньшей мере X% к» второй последовательности, если сравнительный анализ первичной структуры первой последовательности ко второй последовательности демонстрирует, что X% или больше положений второй последовательности полностью комплементарны первой последовательности. Например, последовательность AAGA включает последовательность с 100% идентичностью последовательности AAG, если при сравнительном анализе продемонстрирована 100% идентичность ко всем парам трех положений второй последовательности. Различия между РНК и ДНК (обычно замена уридина на тимидин или наоборот) и наличие аналогов нуклеозида, таких как модифицированные уридины, не влияют на различия в идентичности или взаимозависимости среди полинуклеотидов, пока у соответствующих нуклеотидов (таких как тимидин, уридин, или модифицированный уридин) сохраняется комплементарность (например, аденозин для всех из: тимидина, уридина, или модифицированного уридина; еще одним примером является цитозин и 5-

метилцитозин, оба из которых комплементарны гуанозину). Таким образом, например, последовательность 5'-AXG, где X является любым модифицированным уридином, таким как псевдоуридин, N1-метил псевдоуридин, или 5-метоксиуридин, считается 100% идентичной к AUG, потому что оба полностью комплементарны к той же самой последовательности (5'-CAU). Иллюстративными алгоритмами сравнительного анализа являются общепринятые алгоритмы Smith-Waterman и Needleman-Wunsch. Для специалиста в рассматриваемой области техники понятен выбор алгоритма и адекватных параметров выбора данной пары последовательностей, чтобы при сравнительном анализе первичной структуры последовательностей получить последовательности в целом близкой длины и ожидаемой идентичности более 50% для аминокислот или более 75% для нуклеотидов. Алгоритм Needleman-Wunsch с параметрами настройки интерфейса алгоритма Needleman-Wunsch по умолчанию предоставлены на сервере EBI в www.ebi.ac.uk и в целом являются применимыми.

[289] Термины «около» или «приблизительно» означают приемлемую ошибку для специфического значения, как определено одним из обычных современных подходов, которая зависит частично от того, как измерено или определено значение.

II. Композиции

A. Композиции, включающие РНК гид (gRNAs)

[290] Предлагаемые в данном документе композиции применимы для редактирования гена *TTR*, например, используя гид РНК с агентом, связывающим РНК с ДНК для ориентирования РНК (например, система CRISPR/Cas). Композиции могут быть введены субъектам с диким типом или недиким типом последовательностей гена *TTR*, таким, как, например, субъекты с ATTR, у которых может быть ATTR wt, или наследственная или семейная формы ATTR. Последовательности гида, таргетные для гена *TTR*, представлены в Таблице 1 для SEQ ID №: 5-82.

Таблица 1: Последовательности, таргетные для *TTR* гида, номенклатура, положение на хромосомах и сиквенс.

SEQ ID No.	Идент-р гида	Описание	Вид	Хромосомное расположение	Последовательности гида*
5	CR003335	TTR (Экзон 1)	Человек	chr18:31591917-31591937	CUGCUCUCCUC UGCCUUGC
6	CR003336	TTR (Экзон 1)	Человек	chr18:31591922-31591942	CCUCCUCUGCCU UGCUGGAC
7	CR003337	TTR (Экзон 1)	Человек	chr18:31591925-31591945	CCAGUCCAGCAA GGCAGAGG
8	CR003338	TTR (Экзон 1)	Человек	chr18:31591928-31591948	AUACCAGUCCAG CAAGGCAG

9	CR003339	TTR (Экзон 1)	Человек	chr18:31591934- 31591954	ACACAAAUACCA GUCCAGCA
10	CR003340	TTR (Экзон 1)	Человек	chr18:31591937- 31591957	UGGACUGGUAUU UGUGUCUG
11	CR003341	TTR (Экзон 1)	Человек	chr18:31591941- 31591961	CUGGUAUUUGUG UCUGAGGC
12	CR003342	TTR (Экзон 2)	Человек	chr18:31592880- 31592900	CUUCUCUACACC CAGGGCAC
13	CR003343	TTR (Экзон 2)	Человек	chr18:31592902- 31592922	CAGAGGACACUU GGAUUCAC
14	CR003344	TTR (Экзон 2)	Человек	chr18:31592911- 31592931	UUUGACCAUCAG AGGACACU
15	CR003345	TTR (Экзон 2)	Человек	chr18:31592919- 31592939	UCUAGAACUUUG ACCAUCAG
16	CR003346	TTR (Экзон 2)	Человек	chr18:31592928- 31592948	AAAGUUCUAGAU GCUGUCCG
17	CR003347	TTR (Экзон 2)	Человек	chr18:31592948- 31592968	CAUUGAUGGCAG GACUGCCU
18	CR003348	TTR (Экзон 2)	Человек	chr18:31592948- 31592968	AGGCAGUCCUGC CAUCA AUG
19	CR003349	TTR (Экзон 2)	Человек	chr18:31592958- 31592978	UGCACGGCCACA UUGAUGGC
20	CR003350	TTR (Экзон 2)	Человек	chr18:31592962- 31592982	CACAUGCACGGC CACAUGA
21	CR003351	TTR (Экзон 2)	Человек	chr18:31592974- 31592994	AGCCUUUCUGAA CACAUGCA
22	CR003352	TTR (Экзон 2)	Человек	chr18:31592986- 31593006	GAAAGGCUGCUG AUGACACC
23	CR003353	TTR (Экзон 2)	Человек	chr18:31592987- 31593007	AAAGGCUGCUGA UGACACCU
24	CR003354	TTR (Экзон 2)	Человек	chr18:31593003- 31593023	ACCUGGGAGCCA UUUGCCUC
25	CR003355	TTR (Экзон 2)	Человек	chr18:31593007- 31593027	CCCAGAGGCAAA UGGCUCCC

26	CR003356	TTR (Экзон 2)	Человек	chr18:31593015- 31593035	GCAACUUACCCA GAGGCAAA
27	CR003357	TTR (Экзон 2)	Человек	chr18:31593022- 31593042	UUCUUUGGCAAC UUACCCAG
28	CR003358	TTR (Экзон 3)	Человек	chr18:31595127- 31595147	AUGCAGCUCUCC AGACUCAC
29	CR003359	TTR (Экзон 3)	Человек	chr18:31595126- 31595146	AGUGAGUCUGGA GAGCUGCA
30	CR003360	TTR (Экзон 3)	Человек	chr18:31595127- 31595147	GUGAGUCUGGAG AGCUGCAU
31	CR003361	TTR (Экзон 3)	Человек	chr18:31595140- 31595160	GCUGCAUGGGCU CACAACUG
32	CR003362	TTR (Экзон 3)	Человек	chr18:31595143- 31595163	GCAUGGGCUCAC AACUGAGG
33	CR003363	TTR (Экзон 3)	Человек	chr18:31595156- 31595176	ACUGAGGAGGAA UUUGUAGA
34	CR003364	TTR (Экзон 3)	Человек	chr18:31595157- 31595177	CUGAGGAGGAAU UUGUAGAA
35	CR003365	TTR (Экзон 3)	Человек	chr18:31595170- 31595190	UGUAGAAGGGA UAUACAAAG
36	CR003366	TTR (Экзон 3)	Человек	chr18:31595193- 31595213	AAAUAGACACCA AAUCUAC
37	CR003367	TTR (Экзон 3)	Человек	chr18:31595197- 31595217	AGACACCAAUC UUACUGGA
38	CR003368	TTR (Экзон 3)	Человек	chr18:31595205- 31595225	AAGUGCCUCCA GUAAGAUU
39	CR003369	TTR (Экзон 3)	Человек	chr18:31595235- 31595255	CUCUGCAUGCUC AUGGAAUG
40	CR003370	TTR (Экзон 3)	Человек	chr18:31595236- 31595256	CCUCUGCAUGCU CAUGGAAU
41	CR003371	TTR (Экзон 3)	Человек	chr18:31595237- 31595257	ACCUCUGCAUGC UCAUGGAA
42	CR003372	TTR (Экзон 3)	Человек	chr18:31595242- 31595262	UACUCACCUCUG CAUGCUCU

43	CR003373	TTR (Экзон 4)	Человек	chr18:31598570- 31598590	GUAUUCACAGCC AACGACUC
44	CR003374	TTR (Экзон 4)	Человек	chr18:31598583- 31598603	GCGGCGGGGGCC GGAGUCGU
45	CR003375	TTR (Экзон 4)	Человек	chr18:31598592- 31598612	AAUGGUGUAGCG GCGGGGGC
46	CR003376	TTR (Экзон 4)	Человек	chr18:31598596- 31598616	CGGCAAUGGUGU AGCGGCGG
47	CR003377	TTR (Экзон 4)	Человек	chr18:31598597- 31598617	GCGGCAAUGGUG UAGCGGCG
48	CR003378	TTR (Экзон 4)	Человек	chr18:31598598- 31598618	GGCGGCAAUGGU GUAGCGGC
49	CR003379	TTR (Экзон 4)	Человек	chr18:31598599- 31598619	GGGCGGCAAUGG UGUAGCGG
50	CR003380	TTR (Экзон 4)	Человек	chr18:31598602- 31598622	GCAGGGCGGCAA UGGUGUAG
51	CR003381	TTR (Экзон 4)	Человек	chr18:31598610- 31598630	GGGGCUCAGCAG GGCGGCAA
52	CR003382	TTR (Экзон 4)	Человек	chr18:31598616- 31598636	GGAGUAGGGGCU CAGCAGGG
53	CR003383	TTR (Экзон 4)	Человек	chr18:31598619- 31598639	AUAGGAGUAGG GGCUCAGCA
54	CR003384	TTR (Экзон 4)	Человек	chr18:31598620- 31598640	AAUAGGAGUAG GGGCUCAGC
55	CR003385	TTR (Экзон 4)	Человек	chr18:31598626- 31598646	CCCUACUCCUA UCCACCA
56	CR003386	TTR (Экзон 4)	Человек	chr18:31598629- 31598649	CCGUGGUGGAAU AGGAGUAG
57	CR003387	TTR (Экзон 4)	Человек	chr18:31598630- 31598650	GCCGUGGUGGAA UAGGAGUA
58	CR003388	TTR (Экзон 4)	Человек	chr18:31598637- 31598657	GACGACAGCCGU GGUGGAAU
59	CR003389	TTR (Экзон 4)	Человек	chr18:31598643- 31598663	AUUGGUGACGAC AGCCGUGG

60	CR003390	TTR (Экзон 4)	Человек	chr18:31598646- 31598666	GGGAUUGGUGAC GACAGCCG
61	CR003391	TTR (Экзон 4)	Человек	chr18:31598647- 31598667	GGCUGUCGUCAC CAAUCCCA
62	CR003392	TTR (Экзон 4)	Человек	chr18:31598661- 31598681	AGUCCCUCAUUC CUUGGGAU
63	CR005298	TTR (Экзон 1)	Человек	chr18:31591883- 31591903	UCCACUCAUUCU UGGCAGGA
64	CR005299	TTR (Экзон 4)	Человек	chr18:31598631- 31598651	AGCCGUGGUGGA AUAGGAGU
65	CR005300	TTR (Экзон 1)	Человек	chr18:31591967- 31591987	UCACAGAAACAC UCACCGUA
66	CR005301	TTR (Экзон 1)	Человек	chr18:31591968- 31591988	GUCACAGAAACA CUCACCGU
67	CR005302	TTR (Экзон 2)	Человек	chr18:31592874- 31592894	ACGUGUCUUCUC UACACCCA
68	CR005303	TTR (Экзон 2)	Человек	chr18:31592903- 31592923	UGAAUCCAAGUG UCCUCUGA
69	CR005304	TTR (Экзон 2)	Человек	chr18:31592969- 31592989	GGCCGUGCAUGU GUUCAGAA
70	CR005305	TTR (Экзон 3)	Человек	chr18:31595114- 31595134	UAUAGGAAAACC AGUGAGUC
71	CR005306	TTR (Экзон 3)	Человек	chr18:31595204- 31595224	AAAUCUUACUGG AAGGCACU
72	CR005307	TTR (Экзон 4)	Человек	chr18:31598548- 31598568	UGUCUGUCUUCU CUCAUAGG
73	CR000689	TTR	Обезьяна	chr18:50681533- 50681553	ACACAAAUACCA GUCCAGCG
74	CR005364	TTR	Обезьяна	chr18:50680481- 50680501	AAAGGCUGCUGA UGAGACCU
75	CR005365	TTR	Обезьяна	chr18:50680520- 50680540	CAUUGACAGCAG GACUGCCU
76	CR005366	TTR	Обезьяна	chr18:50681539- 50681559	AUACCAGUCCAG CGAGGCAG

77	CR005367	TTR	Обезьяна	chr18:50681542-50681562	CCAGUCCAGCGA GGCAGAGG
78	CR005368	TTR	Обезьяна	chr18:50681545-50681565	CCUCCUCUGCCU CGCUGGAC
79	CR005369	TTR	Обезьяна	chr18:50680540-50680560	AAAGUUCUAGAU GCCGUCCG
80	CR005370	TTR	Обезьяна	chr18:50680594-50680614	ACUUGUCUUCUC UAUACCCA
81	CR005371	TTR	Обезьяна	chr18:50678216-50678236	AAGUGACUCCA GUAAGAUU
82	CR005372	TTR	Обезьяна	chr18:50680482-50680502	AAAAGGCUGCUG AUGAGACC

[291] Каждая из приведенных выше последовательностей гена может дополнительно включать дополнительные нуклеотиды для формирования crRNA, например, со следующей иллюстративной последовательностью нуклеотидов, которая следует за последовательностью гена на его 3'-конце: GUUUUAGAGCUAUGCUGUUUUG (SEQ ID №: 126). В случае sgRNA, вышеприведенные последовательности гена могут дополнительно включать нуклеотиды для формирования sgRNA, например, со следующей иллюстративной последовательностью нуклеотидов после 3' конца последовательности гена:

GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGA
AAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU (SEQ ID №: 125) в ориентации от 5' к 3' концу.

[292] В некоторых вариантах воплощения изобретения sgRNA является модифицированной. В некоторых вариантах воплощения изобретения sgRNA включает шаблон модификации, представленный ниже в SEQ ID №: 3, где N является любым естественным или искусственным нуклеотидом, и где совокупность N содержат последовательность гена, как описано в представленном документе, и модифицированная sgRNA включает следующую последовательность: mN*mN*mN*NNNNNNNNNNNNNNNNNGUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU (SEQ ID №: 3), где «N» может быть любым естественным или искусственным нуклеотидом. Например, настоящий пример является SEQ ID №: 3, где N's заменяются любой последовательностью гена, раскрытой в представленном документе. Модификации остаются, как показано в SEQ ID №: 3, несмотря на замену N's для нуклеотидов гена. То есть, несмотря на замену нуклеотидов гена этими «N's», первые три нуклеотида являются модифицированными 2'OMe и сохраняются фосфоротиоатные связи между первым и вторым нуклеотидом, между вторым и третьим нуклеотидом и между третьим и четвертым

нуклеотидами.

[293] В некоторых вариантах воплощения изобретения охвачена любая из последовательностей, приведенных в Таблице 2.

Таблица 2: Последовательности таргетные к sgRNA TTR

SEQ ID №	Идент-р гида	Мишень и описание	Вид	Последовательность
87	G000480	Модифицированная последовательность TTR sgRNA	Человек	mA*mA*mA*GGCUGCUGAUGACAC CUGUUUUAGAmGmCmUmAmGmA mAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAU AAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCm UmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGm GmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGm GmUmGmCmU*mU*mU*mU
88	G000481	Модифицированная последовательность TTR sgRNA	Человек	mU*mC*mU*AGAACUUUGACCAUC AGGUUUUAGAmGmCmUmAmGmA mAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAU AAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCm UmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGm GmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGm GmUmGmCmU*mU*mU*mU
89	G000482	Модифицированная последовательность TTR sgRNA	Человек	mU*mG*mU*AGAAGGGAUUAUACAA AGGUUUUAGAmGmCmUmAmGmA mAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAU AAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCm UmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGm GmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGm GmUmGmCmU*mU*mU*mU
90	G000483	Модифицированная последовательность TTR sgRNA	Человек	mU*mC*mC*ACUCAUUCUUGGCAG GAGUUUUAGAmGmCmUmAmGmA mAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAU AAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCm UmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGm GmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGm GmUmGmCmU*mU*mU*mU

91	G000484	Модифицированная последовательность TTR sgRNA	Человек	mA*mG*mA*CACCAAUUCUUACUG GAGUUUUAGAmGmCmUmAmGmA mAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAU AAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCm UmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGm GmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGm GmUmGmCmU*mU*mU*mU
92	G000485	Модифицированная последовательность TTR sgRNA	Человек	mC*mC*mU*CCUCUGCCUUGCUGG ACGUUUUAGAmGmCmUmAmGmA mAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAU AAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCm UmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGm GmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGm GmUmGmCmU*mU*mU*mU
93	G000486	Модифицированная последовательность TTR sgRNA	Человек	mA*mC*mA*CAAUACCAGUCCAG CAGUUUUAGAmGmCmUmAmGmA mAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAU AAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCm UmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGm GmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGm GmUmGmCmU*mU*mU*mU
94	G000487	Модифицированная последовательность TTR sgRNA	Человек	mU*mU*mC*UUUGGCAACUUACCC AGGUUUUAGAmGmCmUmAmGmA mAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAU AAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCm UmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGm GmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGm GmUmGmCmU*mU*mU*mU
95	G000488	Модифицированная последовательность TTR sgRNA	Человек	mA*mA*mA*GUUCUAGAUGCUGUC CGGUUUUAGAmGmCmUmAmGmA mAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAU AAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCm UmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGm GmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGm GmUmGmCmU*mU*mU*mU

96	G000489	Модифицированная последовательность TTR sgRNA	Человек	mU*mU*mU*GACCAUCAGAGGACA CUGUUUUAGAmGmCmUmAmGmA mAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAU AAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCm UmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGm GmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGm GmUmGmCmU*mU*mU*mU
97	G000490	Модифицированная последовательность TTR sgRNA	Человек	mA*mA*mA*UAGACACCAAUCUU ACGUUUUAGAmGmCmUmAmGmA mAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAU AAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCm UmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGm GmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGm GmUmGmCmU*mU*mU*mU
98	G000491	Модифицированная последовательность TTR sgRNA	Человек	mA*mU*mA*CCAGUCCAGCAAGGC AGGUUUUAGAmGmCmUmAmGmA mAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAU AAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCm UmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGm GmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGm GmUmGmCmU*mU*mU*mU
99	G000492	Модифицированная последовательность TTR sgRNA	Человек	mC*mU*mU*CUCUACACCCAGGGC ACGUUUUAGAmGmCmUmAmGmA mAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAU AAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCm UmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGm GmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGm GmUmGmCmU*mU*mU*mU
100	G000493	Модифицированная последовательность TTR sgRNA	Человек	mA*mA*mG*UGCCUCCAGUAAGA UUGUUUUAGAmGmCmUmAmGmA mAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAU AAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCm UmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGm GmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGm GmUmGmCmU*mU*mU*mU

101	G000494	Модифицированная последовательность TTR sgRNA	Человек	mG*mU*mG*AGUCUGGAGAGCUGC AUGUUUUAGAmGmCmUmAmGmA mAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAU AAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCm UmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGm GmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGm GmUmGmCmU*mU*mU*mU
102	G000495	Модифицированная последовательность TTR sgRNA	Человек	mC*mA*mG*AGGACACUUGGAUUC ACGUUUUAGAmGmCmUmAmGmA mAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAU AAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCm UmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGm GmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGm GmUmGmCmU*mU*mU*mU
103	G000496	Модифицированная последовательность TTR sgRNA	Человек	mG*mG*mC*CGUGCAUGUGUUCAG AAGUUUUAGAmGmCmUmAmGmA mAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAU AAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCm UmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGm GmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGm GmUmGmCmU*mU*mU*mU
104	G000497	Модифицированная последовательность TTR sgRNA	Человек	mC*mU*mG*CUCCUCCUCUGCCUU GCGUUUUAGAmGmCmUmAmGmA mAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAU AAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCm UmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGm GmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGm GmUmGmCmU*mU*mU*mU
105	G000498	Модифицированная последовательность TTR sgRNA	Человек	mA*mG*mU*GAGUCUGGAGAGCUG CAGUUUUAGAmGmCmUmAmGmA mAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAU AAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCm UmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGm GmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGm GmUmGmCmU*mU*mU*mU

106	G000499	Модифицированная последовательность TTR sgRNA	Человек	mU*mG*mA*AUCCAAGUGUCCUCU GAGUUUUAGAmGmCmUmAmGmA mAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAU AAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCm UmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGm GmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGm GmUmGmCmU*mU*mU*mU
107	G000500	Модифицированная последовательность TTR sgRNA	Человек	mC*mC*mA*GUCCAGCAAGGCAGA GGGUUUUAGAmGmCmUmAmGmA mAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAU AAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCm UmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGm GmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGm GmUmGmCmU*mU*mU*mU
108	G000501	Модифицированная последовательность TTR sgRNA	Человек	mU*mC*mA*CAGAAACACUCACCG UAGUUUUAGAmGmCmUmAmGmA mAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAU AAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCm UmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGm GmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGm GmUmGmCmU*mU*mU*mU
109	G000567	Модифицированная последовательность TTR sgRNA	Человек	mG*mA*mA*AGGCUGCUGAUGACA CCGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAm AmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAA GGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUm UmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGm CmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGm UmGmCmU*mU*mU*mU
110	G000568	Модифицированная последовательность TTR sgRNA	Человек	mG*mG*mC*UGUCGUCACCAAUCC CAGUUUUAGAmGmCmUmAmGmA mAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAU AAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCm UmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGm GmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGm GmUmGmCmU*mU*mU*mU

111	G000570	Модифицированная последовательность TTR sgRNA	Человек	mC*mA*mU*UGAUGGCAGGACUGC CUGUUUUAGAmGmCmUmAmGmA mAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAU AAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCm UmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGm GmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGm GmUmGmCmU*mU*mU*mU
112	G000571	Модифицированная последовательность TTR sgRNA	Человек	mG*mU*mC*ACAGAAACACUCACC GUGUUUUAGAmGmCmUmAmGmA mAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAU AAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCm UmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGm GmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGm GmUmGmCmU*mU*mU*mU
113	G000572	Модифицированная последовательность TTR sgRNA	Человек	mC*mC*mC*CUACUCCUAUCCAC CAGUUUUAGAmGmCmUmAmGmA mAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAU AAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCm UmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGm GmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGm GmUmGmCmU*mU*mU*mU
114	G000502	Последовательность специфически модифицированного TTR sgRNA обезьяны	Обезьяна	mA*mC*mA*CAAUACCAGUCCAG CGGUUUUAGAmGmCmUmAmGmA mAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAU AAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCm UmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGm GmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGm GmUmGmCmU*mU*mU*mU
115	G000503	Последовательность специфически модифицированного	Обезьяна	mA*mA*mA*AGGCUGCUGAUGAGA CCGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAm AmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAA GGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUm UmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGm CmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGm

		TTR sgRNA обезьяны		UmGmCmU*mU*mU*mU
116	G000504	Последовательность специфически модифицированного TTR sgRNA обезьяны	Обезьяна	mA*mA*mA*GGCUGCUGAUGAGAC CUGUUUUAGAmGmCmUmAmGmA mAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAU AAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCm UmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGm GmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGm GmUmGmCmU*mU*mU*mU
117	G000505	Последовательность специфически модифицированного TTR sgRNA обезьяны	Обезьяна	mC*mA*mU*UGACAGCAGGACUGC CUGUUUUAGAmGmCmUmAmGmA mAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAU AAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCm UmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGm GmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGm GmUmGmCmU*mU*mU*mU
118	G000506	Последовательность специфически модифицированного TTR sgRNA обезьяны	Обезьяна	mA*mU*mA*CCAGUCCAGCGAGGC AGGUUUUAGAmGmCmUmAmGmA mAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAU AAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCm UmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGm GmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGm GmUmGmCmU*mU*mU*mU
119	G000507	Последовательность специфически модифицированного TTR sgRNA обезьяны	Обезьяна	mC*mC*mA*GUCCAGCGAGGCAGA GGGUUUUAGAmGmCmUmAmGmA mAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAU AAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCm UmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGm GmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGm GmUmGmCmU*mU*mU*mU

120	G000508	Последовательность специфически модифицированного TTR sgRNA обезьяны	Обезьяна	mC*mC*mU*CCUCUGCCUCGCUGG ACGUUUUAGAmGmCmUmAmGmA mAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAU AAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCm UmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGm GmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGm GmUmGmCmU*mU*mU*mU
121	G000509	Последовательность специфически модифицированного TTR sgRNA обезьяны	Обезьяна	mA*mA*mA*GUUCUAGAUGCCGUC CGGUUUUAGAmGmCmUmAmGmA mAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAU AAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCm UmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGm GmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGm GmUmGmCmU*mU*mU*mU
122	G000510	Последовательность специфически модифицированного TTR sgRNA обезьяны	Обезьяна	mA*mC*mU*UGUCUUCUCUAUACC CAGUUUUAGAmGmCmUmAmGmA mAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAU AAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCm UmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGm GmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGm GmUmGmCmU*mU*mU*mU
123	G000511	Последовательность специфически модифицированного TTR sgRNA обезьяны	Обезьяна	mA*mA*mG*UGACUUCAGUAAGA UUGUUUUAGAmGmCmUmAmGmA mAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAU AAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCm UmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGm GmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGm GmUmGmCmU*mU*mU*mU
124	G000282	TTR	Мышь	mU*mU*mA*CAGCCACGUCUACAG CAGUUUUAGAmGmCmUmAmGmA mAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAU

				AAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCm UmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGm GmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGm GmUmGmCmU*mU*mU*mU
--	--	--	--	---

* = PS связь; «m» = 2'-O-метил нуклеотид

[294] В таблице 3 представлено нормирование картирования IDs гена с соответствующими sgRNA IDs, а также гомология генома обезьяны и IDs картированных генов.

Таблица 3: Таргетные последовательности гена TTR ID картирования и гомология с обезьяной

Описание	Идент-в двухцепочечной РНК гена человека	Идент-р одноцепочечной РНК гена человека	Количество ошибок спаривания в геноме обезьяны	Идент-р сопряженных dgRNA обезьяны	Идент-р сопряженных sgRNA обезьяны
TTR	CR003335	G000497	1		
TTR	CR003336	G000485	1	CR005368	G000508
TTR	CR003337	G000500	1	CR005367	G000507
TTR	CR003338	G000491	1	CR005366	G000506
TTR	CR003339	G000486	1	CR000689	G000502
TTR	CR003340		0		
TTR	CR003341		0		
TTR	CR003342	G000492	нет РАМ у обезьяны		
TTR	CR003343	G000495	нет РАМ у обезьяны		
TTR	CR003344	G000489	0		
TTR	CR003345	G000481	0		
TTR	CR003346	G000488	1	CR005369	G000509
TTR	CR003347	G000570	2	CR005365	G000505
TTR	CR003348		2		
TTR	CR003349		>3		
TTR	CR003350		нет РАМ у обезьяны		
TTR	CR003351		нет РАМ у		

			обезьяны		
TTR	CR003352	G000567	2	CR005372	G000503
TTR	CR003353	G000480	1	CR005364	G000504
TTR	CR003354		1		
TTR	CR003355		1		
TTR	CR003356		3		
TTR	CR003357	G000487	>3		
TTR	CR003358		0		
TTR	CR003359	G000498	0		
TTR	CR003360	G000494	0		
TTR	CR003361		0		
TTR	CR003362		0		
TTR	CR003363		0		
TTR	CR003364		0		
TTR	CR003365	G000482	0		
TTR	CR003366	G000490	0		
TTR	CR003367	G000484	нет РАМ у обезьяны		
TTR	CR003368	G000493	1	CR005371	G000511
TTR	CR003369		0		
TTR	CR003370		0		
TTR	CR003371		0		
TTR	CR003372		0		
TTR	CR003373		1		
TTR	CR003374		2		
TTR	CR003375		2		
TTR	CR003376		2		
TTR	CR003377		2		
TTR	CR003378		2		
TTR	CR003379		2		
TTR	CR003380		1		
TTR	CR003381		1		
TTR	CR003382		0		
TTR	CR003383		0		

TTR	CR003384		0		
TTR	CR003385	G000572	0		
TTR	CR003386		0		
TTR	CR003387		0		
TTR	CR003388		0		
TTR	CR003389	G000569	0		
TTR	CR003390		0		
TTR	CR003391	G000568	0		
TTR	CR003392		0		
TTR	CR005298	G000483	1		
TTR	CR005299		0		
TTR	CR005300	G000501	нет РАМ у обезьяны		
TTR	CR005301	G000571	0		
TTR	CR005302		2	CR005370	G000510
TTR	CR005303	G000499	0		
TTR	CR005304	G000496	>3		
TTR	CR005305		0		
TTR	CR005306		1		
TTR	CR005307		0		

[295] В некоторых вариантах воплощения изобретения обеспечивается композиция, содержащая одну или более РНК гидов (gRNA), которые включают последовательности гида, которые ориентируют агент, связывающий РНК гид с ДНК, который может быть нуклеазой (например, Cas нуклеаза, такая как Cas9), к целевой последовательности ДНК в *TTR*. Такая gRNA может включать crRNA, включающую последовательность гида, представленную в Таблице 1. Такая gRNA может включать crRNA, содержащую 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов последовательности гида, представленной в Таблице 1. В некоторых вариантах воплощения изобретения, такая gRNA включает crRNA включающую последовательность с приблизительно 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99% или 100% идентичности по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов последовательности гида, представленной в Таблице 1. В некоторых вариантах воплощения изобретения такая gRNA включает crRNA, включающую последовательность с приблизительно 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99% или 100% идентичностью к последовательности гида, представленной в Таблице 1. gRNA может дополнительно включать trRNA. В каждой композиции и способе вариантов воплощения изобретения, представленных в этом документе, crRNA и trRNA могут быть ассоциированы с гидом одноцепочечной РНК (sgRNA), или могут быть

двухцепочечными РНК (dgRNA). В контексте sgRNAs, компоненты crRNA и trRNA могут быть ковалентно связаны, например, через фосфодиэстерную связь или другую ковалентную связь.

[296] В каждой из композиций, использований и способов, представленных в данном документе вариантов воплощения, РНК гид может включать две молекулы РНК как «двойную РНК гид» или «dgRNA». Эта dgRNA включает первую молекулу РНК, включающую crRNA, которая содержит, например, последовательность гида, представленную в Таблице 1, и вторую молекулу РНК, включающую trRNA. Молекулы первой и второй РНК могут не быть ковалентно связаны, но могут образовывать дуплекс РНК через спаривание оснований между сегментами crRNA и trRNA.

[297] В каждой из композиций, использований и способов, представленных в данном документе вариантов воплощения, РНК гида могут включать одну молекулу РНК как «одну РНК гид» или «sgRNA». Эта sgRNA может включать crRNA (или ее часть) включающую последовательность гида, представленную в Таблице 1, ковалентно связанную с trRNA. Эта sgRNA может включать 17, 18, 19, или 20 смежных нуклеотидов последовательности гида, представленной в Таблице 1. В некоторых вариантах воплощения изобретения crRNA и trRNA ковалентно связаны через линкер. В некоторых вариантах воплощения изобретения sgRNA формирует структуру типа «стебель-петля» из соединенных с помощью основания фрагментов crRNA и trRNA. В некоторых вариантах воплощения изобретения crRNA и trRNA ковалентно связаны через одну или более связей, которые не являются фосфодиэстерным связями.

[298] В некоторых вариантах воплощения изобретения trRNA может включать всю или часть последовательности trRNA, полученной из системы CRISPR/Cas природного происхождения. В некоторых вариантах воплощения изобретения trRNA включает процессированную или модифицированную trRNA дикого типа. Длина trRNA зависит от используемой системы CRISPR/Cas. В некоторых вариантах воплощения изобретения trRNA включает или состоит из 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, или более чем 100 нуклеотидов. В некоторых вариантах воплощения изобретения trRNA может включать специфические вторичные структуры, такие как, например, одна или более шпильчатых или петлевых структур, или одна или более выпетливающих структур.

[299] В некоторых вариантах воплощения, изобретение предоставляет композицию, включающую одну или более РНК гид, которая содержит любую последовательность гида из SEQ ID №: 5-82.

[300] В одном аспекте изобретение предоставляет композицию, включающую gRNA, которая включает последовательность гида, которая по меньшей мере на 99, 98, 97, 96, 95, 94, 93, 92, 91% или 90% идентична любой из нуклеиновых кислот SEQ ID №: 5-82.

[301] В других вариантах воплощения изобретения композиция включает по меньшей мере один, например по меньшей мере две gRNA, включающих последовательности гида, выбранные из любых двух или более последовательностей гида

SEQ ID №: 5-82. В некоторых вариантах воплощения изобретения композиция включает по меньшей мере две gRNA, каждая из которых включает последовательность гида по меньшей мере на 99, 98, 97, 96, 95, 94, 93, 92, 91% или 90% идентичную любой из нуклеиновых кислот SEQ ID №: 5-82.

[302] В некоторых вариантах воплощения изобретения gRNA является sgRNA, включающей любую из последовательностей, представленных в Таблице 2 (SEQ ID № 87-124). В некоторых вариантах воплощения изобретения gRNA является sgRNA, включающей любую из последовательностей, представленных в Таблице 2 (SEQ ID № 87-124), которые не подвергались модификациям (то есть, не модифицированные SEQ ID № 87-124). В некоторых вариантах воплощения изобретения sgRNA включает последовательность, которая по меньшей мере на 99, 98, 97, 96, 95, 94, 93, 92, 91% или 90%, идентична любой из нуклеиновых кислот SEQ ID № 87-124. В некоторых вариантах воплощения изобретения sgRNA включает последовательность, которая по меньшей мере на 99, 98, 97, 96, 95, 94, 93, 92, 91% или 90% идентична любой из нуклеиновых кислот SEQ ID № 87-124, но без представленных модификаций (то есть, не модифицированные SEQ ID № 87-124). В некоторых вариантах воплощения изобретения sgRNA включает любую из последовательностей гида, представленных в Таблице 1, когда вместо последовательностей гида, представленных в последовательностях sgRNA Таблицы 2 SEQ ID №: 87-124 модифицированных или без модификаций.

[303] Композиции РНК гида настоящего изобретения разработаны для распознавания (например, гибридизированной) таргетной последовательности в гене *TTR*. Например, таргетная последовательность *TTR*, может быть распознана и расщеплена предоставленной Cas рестриктазой, включающей РНК гид. В некоторых вариантах воплощения изобретения агент, связывающий РНК гид с ДНК, такой как Cas рестриктаза, может быть проводником РНК гида к таргетной последовательности гена *TTR*, где последовательность проводника РНК гида гибридизируется с таргетной последовательностью и агент, связывающий РНК гид с ДНК, такой как Cas рестриктаза, расщепляет таргетную последовательность.

[304] В некоторых вариантах воплощения изобретения выбор одной или более РНК гида определен основываясь на таргетных последовательностях в структуре гена *TTR*.

[305] Не привязываясь к любой из конкретных теорий, мутации (например, мутации со сдвигом рамки считывания, с последующими инсерциями/делециями, которые являются результатом DSB, опосредованным нуклеазой) в определенных локусах гена, могут быть менее толерантными, по сравнению с мутациями в других локусах гена, таким образом позиция DSB является важным фактором в количестве или характере заключительного нокдауна белка. В некоторых вариантах воплощения изобретения используется дополнительная gRNA или комплементарная к таргетной последовательности в структуре *TTR*, чтобы ориентировать агент, связывающий РНК гид с ДНК, на специфический сайт в гене *TTR*. В некоторых вариантах воплощения изобретения gRNAs разработаны с последовательностью гида, которые комплементарны или имеют комплементарность к

таргетным последовательностям в экзоне 1, экзоне 2, экзоне 3 или экзоне 4 в *TTR*.

[306] В некоторых вариантах воплощения изобретения последовательность гида является по меньшей мере на 99, 98, 97, 96, 95, 94, 93, 92, 91% или 90% идентичной презентуемым таргетным последовательностям в гене *TTR* человека. В некоторых вариантах воплощения изобретения таргетная последовательность может быть комплементарна к гидовой последовательности РНК гида. В некоторых вариантах воплощения изобретения степень комплементарности или идентичности между гидовой последовательностью РНК гида и ее соответствующей таргетной последовательностью может составлять по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99% или 100%. В некоторых вариантах воплощения изобретения таргетная последовательность и последовательность гида gRNA могут быть на 100% комплементарными или идентичными. В других вариантах воплощения изобретения таргетная последовательность и последовательность гида gRNA могут содержать по меньшей мере одно несоответствие. Например, таргетная последовательность и последовательность гида gRNA могут содержать 1, 2, 3, или 4 несоответствия, где общая длина последовательности гида является 20. В некоторых вариантах воплощения изобретения таргетная последовательность и последовательность гида gRNA могут содержать 1-4 несоответствия, где последовательность гида представлена 20 нуклеотидами.

[307] В некоторых вариантах воплощения изобретения, композиция или состав, раскрытые в представляемом документе включают мРНК, содержащую открытую рамку для считывания (ORF), кодирующую агент, связывающий РНК гид с ДНК, представленный нуклеазой Cas, как описано в настоящем документе. В некоторых вариантах воплощения изобретения мРНК, содержащая ORF, кодирующую агент, связывающий РНК гид с ДНК, являются предоставляемой, вводимой или используемой нуклеазой Cas.

[308] В некоторых вариантах воплощения изобретения агентом, связывающим РНК гид с ДНК, является нуклеаза Cas Класса 2. В некоторых вариантах воплощения изобретения агенту, связывающему РНК гид с ДНК, присуща эндонуклеазная активность, которая может также упоминаться как двухнитевая эндонуклеазная активность. В некоторых вариантах воплощения изобретения агент, связывающий РНК гид с ДНК, включает нуклеазу Cas, такую как нуклеаза Cas Класса 2 (которая может быть, например, нуклеазой Cas Типа II, V, или VI). Нуклеазы Cas класса 2 включают, например, Cas9, Cpf1, C2c1, C2c2, белки C2c3 и их модификации. Примеры нуклеаз Cas9 включают таковые из системы Типа II CRISPR *S. pyogenes*, *S. aureus* и другие прокариоты (смотрите, например, перечень в следующем параграфе), и их модифицированные версии (например, сконструированный или мутант). Смотрите, например, US2016/0312198 A1; US 2016/0312199 A1. Другие примеры нуклеаз Cas включают комплекс Csm или Cmr системы типа III CRISPR или Cas 10, или их субъединицы Csm 1, или Cmr 2; и каскадный комплекс типа I системы CRISPR, или их подгруппу Cas 3. В некоторых вариантах воплощения изобретения нуклеаза Cas может быть от Типа-А, Типа-ПВ, или системы Типа-ПС. Обсуждение различных систем CRISPR и нуклеаз Cas представлено в работах: Makarova et

al., NAT. REV. MICROBIOL. 9:467-477 (2011); Makarova et al., NAT. REV. MICROBIOL, 13: 722-36 (2015); Shmakov et al., MOLECULAR CELL, 60:385-397 (2015).

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

[310] В некоторых вариантах воплощения изобретения нуклеаза Cas является Cas9 нуклеазой из *Streptococcus pyogenes*. В некоторых вариантах воплощения изобретения нуклеаза Cas является Cas9 нуклеазой из *Streptococcus thermophilus*. В некоторых вариантах воплощения изобретения нуклеаза Cas является Cas9 нуклеазой из *Neisseria meningitidis*. В некоторых вариантах воплощения изобретения нуклеаза Cas является Cas9 нуклеазой из *Staphylococcus aureus*. В некоторых вариантах воплощения изобретения нуклеаза Cas является нуклеазой Cpf1 из *Francisella novicida*. В некоторых вариантах воплощения изобретения нуклеаза Cas является нуклеазой Cpf1 из *Acidaminococcus sp.* В некоторых вариантах воплощения изобретения нуклеаза Cas является нуклеазой Cpf1 из *Lachnospiraceae bacterium ND2006*. В дальнейших вариантах воплощения изобретения нуклеаза Cas является нуклеазой Cpf1 из *Francisella tularensis*, *Lachnospiraceae bacterium*, *Butyrivibrio proteoclasticus*, *Peregrinibacteria bacterium*, *Parcubacteria bacterium*, *Smithella*, *Acidaminococcus*, *Candidatus Methanoplasma termitum*, *Eubacterium eligens*, *Moraxella bovoculi*, *Leptospira inadai*, *Porphyromonas crevioricanis*, *Prevotella disiens* или *Porphyromonas macacae*. В некоторых вариантах воплощения изобретения нуклеаза Cas является нуклеазой Cpf1 из *Acidaminococcus* или *Lachnospiraceae*.

[311] Дикий тип Cas9 характеризуется двумя нуклеазными доменами: RuvC и HNH. Домен RuvC расщепляет нетаргетную нить ДНК, а домен HNH расщепляет таргетную нить ДНК. В некоторых вариантах воплощения изобретения нуклеаза Cas9 включает более чем один домен RuvC и/или более чем один домен HNH. В некоторых вариантах воплощения изобретения нуклеаза Cas9 является нуклеазой дикого типа Cas9. В некоторых вариантах воплощения изобретения Cas9 способна к индукции разрыва двойной цепи в таргетной ДНК. В определенных вариантах воплощения изобретения нуклеаза Cas может расщепить dsDNA, может расщепить одну нить dsDNA, или ей, возможно, не присуща эндонуклеазная или никазная активность к ДНК. Иллюстративная последовательность аминокислоты Cas9 предоставлена как SEQ ID №: 203. Иллюстративная последовательность мРНК Cas9 ORF, которая включает старт и стоп кодоны, представлена как SEQ ID №: 204. Иллюстративная последовательность Cas9, кодируемая мРНК, подходящая для включения в рекомбинантный белок, предоставлена как SEQ ID №: 210.

[312] В некоторых вариантах воплощения изобретения используются химерные нуклеазы Cas, в которых один домен или участок домена белка заменен частью другого белка. В некоторых вариантах воплощения изобретения домен нуклеазы Cas может быть заменен доменом другой нуклеазы, такой как FokI. В некоторых вариантах воплощения изобретения нуклеаза Cas может быть модифицированной нуклеазой.

[313] В других вариантах воплощения нуклеаза Cas может быть из Типа I системы CRISPR/Cas. В некоторых вариантах воплощения изобретения нуклеаза Cas может быть компонентом комплекса каскад Типа I системы CRISPR/Cas. В некоторых вариантах воплощения изобретения нуклеаза Cas может быть белком Cas 3. В некоторых вариантах воплощения изобретения нуклеаза Cas может быть из Типа III системы CRISPR/Cas. В некоторых вариантах воплощения изобретения нуклеаза Cas может обладать активностью расщепления РНК.

[314] В некоторых вариантах воплощения изобретения агент, связывающий РНК гид с ДНК, обладает активностью одноцепочечной никазы, то есть, может осуществлять разрыв одной цепи ДНК, также известный как «ник». В некоторых вариантах воплощения изобретения агент, связывающий РНК гид с ДНК, включает Cas никазу. Никаза является ферментом, который рассекает dsDNA, то есть, рассекает одну нить двойной спирали ДНК, но не другую. В некоторых вариантах воплощения изобретения Cas никаза является версией нуклеазы Cas (например, нуклеаза Cas, обсужденная выше), в которой эндонуклеазная активная зона инактивирована, например, одной или более альтерациями (например, точечными мутациями) в каталитическом домене. См., например, Патент США № 8 889 356 для обсуждения Cas никаз и иллюстративных каталитических альтераций домена. В некоторых вариантах воплощения изобретения Cas никаза, такая как Cas9 никаза, является инактивированным RuvC или HNH доменом. Иллюстративная аминокислотная последовательность Cas9 никазы представлена как SEQ ID №:206. Иллюстративная последовательность Cas9 никазы мРНК ORF, которая включает старт и стоп кодоны, предоставлена как SEQ ID №: 207. Иллюстративная мРНК, кодирующая

последовательность Cas9 никазы, которая уместна для включения в рекомбинантный белок, предоставлена как SEQ ID №: 211.

[315] В некоторых вариантах воплощения изобретения агент, связывающий РНК гид с ДНК, модифицирован, чтобы содержать только один функциональный домен нуклеазы. Например, белок носитель может быть модифицирован таким образом, что один из доменов нуклеазы видоизменен, полностью или частично удален для снижения ее активности по расщеплению нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах воплощения изобретения никаза используется при наличии RuvC домена со сниженной активностью. В некоторых вариантах воплощения изобретения никаза используется при наличии неактивного RuvC домена. В некоторых вариантах воплощения изобретения никаза используется при наличии домена HNH со сниженной активностью. В некоторых вариантах воплощения изобретения никаза используется при наличии неактивного домена HNH.

[316] В некоторых вариантах воплощения изобретения консервативную аминокислоту в домене нуклеазы белка Cas заменяют для уменьшения или изменения активности нуклеазы. В некоторых вариантах воплощения изобретения нуклеаза Cas может включать замену аминокислоты в RuvC или RuvC-подобном домене нуклеазы. Иллюстративные замены аминокислоты в RuvC или RuvC-подобных доменах нуклеазы включают D10A (с использованием белка Cas9 из *S.pyogenes*). См. например, Zetsche et al. (2015) *Cell Oct 22:163(3): 759-771*. В некоторых вариантах воплощения изобретения нуклеаза Cas может включать замену аминокислоты в HNH или HNH-подобном домене нуклеазы. Иллюстративные замены аминокислоты в HNH или HNH-подобном домене нуклеазы включают E762A, H840A, N863A, H983A, и D986A (с использованием белка Cas9 из *S. Pyogenes*) См.. например, Zetsche et al. (2015). Последующие иллюстративные замены аминокислоты включают D917A, E1006A, и D1255A (с использованием последовательности U112 Cpf1 (FnCpf1) из *Francisella novicida* - A0Q7Q2 (CPF1_FRATN)).

[317] В некоторых вариантах воплощения изобретения мРНК, кодирующая никазу, предоставляется в комбинации с парой РНК гида, которые комплементарны смысловым и антисмысловым нитям таргетной последовательности, соответственно. В этом варианте воплощения РНК гид ориентирует никазу к таргетной последовательности и выполняет DSB, генерируя ник на противоположных цепях таргетной последовательности (то есть, два разрыва). В некоторых вариантах воплощения изобретения использование двойного разрыва может улучшить специфичность и снизить нетаргетные эффекты. В некоторых вариантах воплощения изобретения никаза используется вместе с двумя отдельными РНК гидами, предназначенными для противоположных цепей ДНК, чтобы произвести двойной разрыв в таргетной ДНК. В некоторых вариантах воплощения изобретения никаза используется вместе с двумя отдельными РНК гидами, которые выбраны для выполнения двойного разрыва в непосредственной близости к таргетной ДНК.

[318] В некоторых вариантах воплощения изобретения агент, связывающий РНК гид с ДНК, характеризуется недостаточной эндонуклеазной и никазной активностями. В некоторых вариантах воплощения изобретения агент, связывающий РНК гид с ДНК,

включает dCas полипептид, связанный с ДНК. dCas полипептид обладает активностью, связанной с ДНК, и в то же время характеризуется чрезвычайно низкой каталитической активностью эндонуклеазы/никазы. В некоторых вариантах воплощения изобретения dCas полипептид является dCas9 полипептидом. В некоторых вариантах воплощения изобретения агент, связывающий РНК гид с ДНК, обладает недостаточной расщепляющей и никазной активностью или dCas полипептид, связанный с ДНК, является версией нуклеазы Cas (например, нуклеазы Cas, обсужденной выше), в которой инактивированы эндонуклеазные активные зоны в каталитических доменах, например, одной или более альтерациями (например, точечными мутациями). Смотрите, например, Патенты США № 2014/0186958 A1; № 2015/0166980 A1. Иллюстративная аминокислотная последовательность dCas9 предоставлена как SEQ ID №: 208. Иллюстративная последовательность мРНК dCas9 ORF, которая включает старт и стоп кодоны, предоставлены как SEQ ID №: 209. Иллюстративная кодирующая последовательность dCas9 мРНК, которая транскрибирует гибридный белок, предоставлена как SEQ ID №: 212.

[319] В некоторых вариантах воплощения изобретения агент, связывающий РНК гид с ДНК, включает один или более гетерологичных функциональных доменов (например, включает гибридный полипептид или является таковым).

[320] В некоторых вариантах воплощения изобретения гетерологичный функциональный домен может способствовать перемещению агента, связывающего РНК гид с ДНК, в ядро клетки. Например, гетерологичный функциональный домен может быть сигналом ядерной локализации (NLS). В некоторых вариантах воплощения изобретения агент, связывающий РНК гид с ДНК, может быть гибридизирован с 1-10 NLS. В некоторых вариантах воплощения изобретения агент, связывающий РНК гид с ДНК, может быть гибридизирован с 1-5 NLS. В некоторых вариантах воплощения изобретения агент, связывающий РНК гид с ДНК, может быть гибридизирован с одним NLS. При использовании одной NLS, она может быть связана с N-терминальными или С-терминальными концами последовательности агента, связывающего РНК гид с ДНК. Она может также быть вставлена в последовательность агента, связывающего РНК гид с ДНК. В других воплощениях изобретения агент, связывающий РНК гид с ДНК, может быть гибридизирован с более чем одной NLS. В некоторых вариантах воплощения изобретения агент, связывающий РНК гид с ДНК, может быть гибридизирован с 2, 3, 4, или 5 NLS. В некоторых вариантах воплощения изобретения агент, связывающий РНК гид с ДНК, может быть гибридизирован с двумя NLS. При определенных обстоятельствах два NLS могут быть одинаковыми (например, два SV40 NLS) или различными. В некоторых вариантах воплощения изобретения агент, связывающий РНК гид с ДНК, гибридизирован с двумя последовательностями NLS SV40, через связь в карбокси-конце. В некоторых вариантах воплощения изобретения агент, связывающий РНК гид с ДНК, может быть гибридизирован с двумя NLS, один связанный в N-конце и один в С-конце. В некоторых вариантах воплощения изобретения агент, связывающий РНК гид с ДНК, может быть гибридизирован с 3 NLS. В некоторых вариантах воплощения изобретения агент, связывающий РНК гид с

ДНК, может быть гибридизирован без NLS. В некоторых вариантах воплощения изобретения NLS может быть одинарной последовательностью, такой как, *например*, NLS SV40, PKKKRKV (SEQ ID №: 274) или PKKKRRV (SEQ ID №:275). В некоторых вариантах воплощения изобретения NLS может быть двойной последовательностью, такой как NLS нуклеоплазмина, KRPAATKKAGQAKKKK (SEQ ID №:276). В определенном варианте воплощения изобретения единичная PKKKRKV (SEQ ID №:274) NLS может быть связана в С-терминальным концом агента, связывающего РНК гид с ДНК. Один или более линкеров произвольно включены на участке гибридизации.

[321] В некоторых вариантах воплощения изобретения гетерологичный функциональный домен может обладать способностью к модификации внутриклеточного периода полураспада агента, связывающего РНК гид с ДНК. В некоторых вариантах воплощения изобретения период полураспада агента, связывающего РНК гид с ДНК, может быть увеличен. В некоторых вариантах воплощения изобретения может быть уменьшен период полураспада агента, связывающего РНК гид с ДНК. В некоторых вариантах воплощения изобретения гетерологичный функциональный домен может быть способен повышать стабильность агента, связывающего РНК гид с ДНК. В некоторых вариантах воплощения изобретения гетерологичный функциональный домен может снижать стабильность агента, связывающего РНК гид с ДНК. В некоторых вариантах воплощения изобретения гетерологичный функциональный домен может действовать как сигнальный пептид для деградации белков. В некоторых вариантах воплощения изобретения деградация белков может осуществляться протеолитическими ферментами, такими как, *например*, протеасомы, лизосомальные протеазы или кальпаин протеазы. В некоторых вариантах воплощения изобретения гетерологичный функциональный домен может включать последовательность PEST. В некоторых вариантах воплощения изобретения агент, связывающий РНК гид с ДНК может быть модифицирован дополнением убиквитина или цепи полиубиквитина. В некоторых вариантах воплощения изобретения убиквитин может быть белком, подобным убиквитину (UBL). Неограничивающие примеры белков, подобных убиквитину, включают малые модификаторы, подобные убиквитину (SUMO), перекрестно-реактивный белок убиквитина (UCRP, также известный как ген 15, стимулируемый интерфероном (ISG15)), связанный с убиквитином модификатор 1 (URM1), белок - предшественник, осуществляющий в процессе развития обратную регуляцию нейронных клеток-8 (NEDD8), также названный Rub1 в *S. cerevisiae*), F-ассоциированный антиген лейкоцитов человека (FAT10), аутофаг 8 (ATG8) и 12 (ATG12), Fau подобный убиквитину белок (FUB1), «заякоренный» мембраной белок UBL (MUB), кольцевой убиквитиновый модификатор-1 (UFM1) и убиквитин-подобный белок 5 (UBL5).

[322] В некоторых вариантах воплощения изобретения гетерологичный функциональный домен может быть маркерным доменом. Неограничивающие примеры маркерных доменов включают флуоресцентные белки, метки очистки, метки эпитопа и последовательности гена репортера. В некоторых вариантах воплощения изобретения маркерный домен может быть флуоресцентным белком. Неограничивающие примеры

специальных флуоресцентных белков включают зеленые флуоресцентные белки (*например*, GFP, GFP-2, tagGFP, turboGFP, sfGFP, EGFP, Emerald, Azami Green, Monomeric Azami Green, CopGFP, AceGFP, ZsGreen1), желтые флуоресцентные белки (*например*, YFP, EYFP, Citrine, Venus, YPet, PhiYFP, ZsYellow1), голубые флуоресцентные белки (*например*, EBFP, EBFP2, Azurite, mKalamal, GFPuv, Sapphire, T-sapphire,), фиолетовые флуоресцентные белки (*например*, ECFP, Cerulean, CyPet, AmCyan1, Midoriishi-Cyan), красные флуоресцентные белки (*например*, mKate, mKate2, mPlum, DsRed monomer, mCherry, mRFP1, DsRed-Express, DsRed2, DsRed-Monomer, HcRed-Tandem, HcRcd1, AsRed2, eqFP611, mRaspberry, mStrawberry, Jred) и оранжевые флуоресцентные белки (mOrange, mKO, Kusabira- Orange, Monomeric Kusabira-Orange, mTangerine, tdTomato) или другие соответствующие флуоресцентные белки. В других воплощениях изобретения маркерный домен может быть меткой очистки и/или меткой эпитопа. Неограничивающие примеры меток включают глутатион-S-трансферазу (GST), хитин-связывающий белок (CBP), белок, связывающий мальтозу (MBP), тиоредоксин (TRX), поли-(NANP), метку тандемной аффинности очистки (TAP), мус, AcV5, AU1, AU5, E, ECS, E2, FLAG, HA, nus, Softag 1, Softag 3, Strep, SBP, Glu-Glu, HSV, KT3, S, S1, T7, V5, VSV-г, 6xHis, 8xHis, белок носителя карбоксила биотина (BCCP), поли-His и кальмомодулин. Неограничивающие примеры генов репортера включают глутатион-S-трансферазу (GST), пероксидазу хрона (HRP), хлорамфеникол ацетилтрансферазу (CAT), бета-галактозидазу, бета-глюкоконоридазу, люциферазу или флуоресцентные белки.

[323] В дополнительных вариантах воплощения гетерологичный функциональный домен может предназначаться для ориентирования агента, связывающего РНК гид с ДНК с определенной органеллой, типом клетки, тканью или органом. В некоторых вариантах воплощения изобретения гетерологичный функциональный домен может предназначаться для ориентирования агента, связывающего РНК гид с ДНК с митохондрией.

[324] В дальнейших вариантах воплощения изобретения гетерологичный функциональный домен может быть эффекторным доменом. Когда агент, связывающий РНК гид с ДНК, направлен к его таргетной последовательности, *например*, когда нуклеаза Cas направлена к таргетной последовательности gRNA, эффекторный домен может модифицировать или повредить таргетную последовательность. В некоторых вариантах воплощения изобретения эффекторный домен может быть выбран из домена, связывающего нуклеиновую кислоту, домена нуклеазы (*например*, домен нуклеазы HeCas), эпигенетического модифицирующего домена, домена активации транскрипции, или домена транскрипционного гена-супрессора. В некоторых вариантах воплощения изобретения, гетерологичный функциональный домен является нуклеазой, такой как нуклеаза FokI. Смотрите, *например*, US Pat. No. 9,023,649. В некоторых вариантах воплощения изобретения, гетерологичный функциональный домен является транскрипционным активатором или репрессором. Смотрите, *например*, Qi et al., «Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression,» *Cell* 152:1173-83 (2013); Perez-Pinera et al., «RNA-guided gene activation by CRISPR-Cas9-based transcription

factors,» *Nat. Methods* 10:973-6 (2013); Mali et al., «CAS9 transcriptional activators for target specificity screening and paired nickases for cooperative genome engineering,» *Nat. Biotechnol.* 31:833-8 (2013); Gilbert et al., «CRISPR-mediated modular RNA-guided regulation of transcription in eukaryotes» *Cell* 154:442-51 (2013). Также, агент, связывающий РНК гид с ДНК, по существу становится фактором транскрипции, который может быть ориентирован на связывание желательной таргетной последовательности, используя РНК гид.

Модифицированные РНК гиды (gRNA) и мРНК

[325] В некоторых вариантах воплощения изобретения gRNA является химически модифицированной. Включение в gRNA одного или более модифицированных нуклеозидов или нуклеотидов называют «модификацией» gRNA или «химической модификацией» gRNA, когда представляют наличие одного или более искусственных и/или естественно встречающихся компонентов или конфигураций, которые используются вместо или в дополнение к каноническому A, G, C и остаткам U. В некоторых вариантах воплощения изобретения модифицированная gRNA синтезируется с неканоническим нуклеозидом или нуклеотидом, что в представленном документе также обозначено как «модифицированный». Модифицированные нуклеозиды и нуклеотиды могут подвергаться одному или более из следующего: (i) альтерации, *например*, замене, одного или обоих из не связанных с фосфатом кислорода и/или одного или более из кислородов, связанных с фосфатом в фосфодиэфирной связи остова (пример модификации остова); (ii) альтерации, *например*, замене, компонента сахара рибозы, *например*, 2' гидроксильных в сахаре рибозы (пример модификации сахара); (iii) общей замене остатка фосфата с «дефосфо-линкерами» (пример модификации остова); (iv) модификации или замене естественно встречающегося нуклеотидного основания, включая неканоническое нуклеотидное основание (пример модификации основания); (v) замене или модификации остова фосфата рибозы (пример модификации остова); (vi) модификации 3' конца или 5' конца олигонуклеотида, *например*, удалению, модификации или замене терминальной группы фосфата или конъюгации остатка, кэпа или линкера (модификации 3' или 5' кэпа могут включать сахар и/или модификацию остова); и (vii) модификации или замене сахара (пример модификации сахара).

[326] Как отмечено выше, в некоторых вариантах воплощения изобретения композиция или состав, раскрытые в этом документе, включают мРНК которая содержит открытую рамку считывания (ORF), которая кодирует агент, связывающий РНК гид с ДНК, такой как нуклеаза Cas, представленная в этом документе. В некоторых вариантах воплощения изобретения мРНК которая содержит ORF, кодирующую агент, связывающий РНК гид с ДНК, такой как нуклеаза Cas, предоставляется, используется или применяется. В некоторых вариантах воплощения изобретения ORF, кодирующая агент, связывающий РНК гид с ДНК нуклеазой, является «модифицированным агентом, связывающий РНК гид с ДНК ORF» или просто «модифицированным ORF», который используется как эвфемизм, указывающий, что ORF модифицирован по одному или более из следующих способов: (1) у модифицированного ORF содержание уридина находится в диапазоне от его

минимального содержания до 150% минимального содержания уридина; (2) у модифицированного ORF содержание динуклеотид уридина в диапазоне от минимального содержания динуклеотид уридина до 150% минимального содержания динуклеотид уридина; (3) у модифицированного ORF есть по меньшей мере 90% идентичность к любому из SEQ ID №: 201, 204, 210, 214, 215, 223, 224, 250, 252, 254, 265, или 266; (4) модифицированная ORF состоит из группы кодонов, в которых, по меньшей мере 75% кодонов являются кодонами, перечисленными в Таблице 3А: минимальные кодоны для уридина; или (5) модифицированная ORF включает по меньшей мере один модифицированный уридин. В некоторых вариантах воплощения изобретения модифицированная ORF модифицирована по меньшей мере в двух, трех или четырех из упомянутых выше путей. В некоторых вариантах воплощения изобретения модифицированная ORF включает по меньшей мере один модифицированный уридин, и изменена согласно одному, двух, трех или всех четырех из упомянутых выше путей (1) - (4).

Таблица 3А Минимальные кодоны для уридина

	Аминокислота	Минимальные кодоны для уридина
A	Аланин	GCA или GCC или GCG
G	Глицин	GGA или GGC или GGG
V	Валин	GUC или GUA или GUG
D	Аспаргиновая кислота	GAC
E	Глутаминовая кислота	GAA или GUA или GUG
I	Изолейцин	AUC или AUA
T	Треонин	ACA или ACC или ACG
N	Аспарагин	AAC
K	Лизин	AAG или AAA
S	Серин	AGC
R	Аргинин	AGA или AGG
L	Лейцин	CUG или CUA или CUC
P	Пролин	CCG или CCA или CCC
H	Гистидин	CAC
Q	Глютамин	CAG или CAA
F	Фенилаланин	UUC
Y	Тирозин	UAC
C	Цистеин	UGC
W	Триптофан	UGG
M.	Метионин	AUG

[327] В любом из предшествующих вариантов воплощения модифицированная ORF может состоять из ряда кодонов, которые по меньшей мере на 75, 80, 85, 90, 95, 98, 99% или 100% являются кодонами, перечисленными в Таблице 3А, в которой представлены минимальные кодоны для уридина.

[328] В любом из предшествующих вариантов воплощения модифицированная ORF может включать последовательность по меньшей мере с 90, 95, 98, 99%, или 100% идентичностью к любому из SEQ ID №: 201, 204, 210, 214, 215, 223, 224, 250, 252, 254, 265 или 266.

[329] В любом из предшествующих вариантов воплощения у модифицированной ORF содержание уридина может быть в диапазоне от минимального содержания уридина до 150, 145, 140, 135, 130, 125, 120, 115, 110, 105, 104, 103, 102% или 101% минимального содержания уридина.

[330] В любом из предшествующих вариантов воплощения у модифицированной ORF содержание уридин динуклеотида может быть в диапазоне от минимального содержания уридин динуклеотида до 150, 145, 140, 135, 130, 125, 120, 115, 110, 105, 104, 103, 102% или 101% минимального содержания уридин динуклеотида.

[331] В любом из предшествующих вариантов воплощения модифицированная ORF может включать модифицированный уридин по меньшей мере в одном, нескольких или во всех положениях уридина. В некоторых вариантах воплощения изобретения модифицированный уридин является уридин-модифицированным в 5 положениях, например, с галогеном, метилом или этилом. В некоторых вариантах воплощения изобретения модифицированный уридин является псевдоуридином, модифицированным в 1 положении, например, с галогеном, метилом или этилом. Модифицированный уридин может быть, например, псевдоуридином, N1-метил-псевдоуридином, 5-метоксиуридином, 5-йодуридином или их комбинацией. В некоторых вариантах воплощения изобретения, модифицированный уридин является 5-метоксиуридином. В некоторых вариантах воплощения изобретения, модифицированный уридин является 5-йодуридином. В некоторых вариантах воплощения изобретения, модифицированный уридин является псевдоуридином. В некоторых вариантах воплощения изобретения, модифицированный уридин является N1-метил-псевдоуридином. В некоторых вариантах воплощения изобретения модифицированный уридин является комбинацией псевдоуридина и N1-метил-псевдоуридина. В некоторых вариантах воплощения изобретения, модифицированный уридин является комбинацией псевдоуридина и 5-метоксиуридина. В некоторых вариантах воплощения изобретения, модифицированный уридин является комбинацией N1-метил псевдоуридина и 5-метоксиуридина. В некоторых вариантах воплощения изобретения, модифицированный уридин является комбинацией 5-йодуридина и N1-метил-псевдоуридина. В некоторых вариантах воплощения изобретения, модифицированный уридин является комбинацией псевдоуридина и 5-йодуридина. В некоторых вариантах воплощения изобретения, модифицированный уридин является комбинацией 5-йодуридина и 5-метоксиуридина.

[332] В некоторых вариантах воплощения изобретения по меньшей мере 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 98, 99% или 100% положений уридина в мРНК согласно представленному раскрытию, являются модифицированными уридинами. В некоторых вариантах воплощения изобретения 10%-25%, 15-25%, 25-35%, 35-45%, 45-55%, 55-65%, 65-75%, 75-85%, 85-95% или 90-100% положений уридина в мРНК согласно раскрытию являются модифицированными уридинами, например, 5-метоксиуридином, 5-йодуридином, N1-метил псевдоуридином, псевдоуридином, или их комбинацией. В некоторых вариантах воплощения изобретения 10%-25%, 15-25%, 25-35%, 35-45%, 45-55%, 55-65%, 65-75%, 75-85%, 85-95% или 90-100% положений уридина в мРНК согласно представленному раскрытию являются 5-метоксиуридином. В некоторых вариантах воплощения изобретения 10%-25%, 15-25%, 25-35%, 35-45%, 45-55%, 55-65%, 65-75%, 75-85%, 85-95% или 90-100% положений уридина в мРНК согласно представляемому раскрытию являются псевдоуридином. В некоторых вариантах воплощения изобретения 10%-25%, 15-25%, 25-35%, 35-45%, 45-55%, 55-65%, 65-75%, 75 85%, 85-95% или 90-100% положений уридина в мРНК согласно представляемому раскрытию являются N1- метил псевдоуридином. В некоторых вариантах воплощения изобретения 10%- 25%, 15-25%, 25-35%, 35-45%, 45-55%, 55-65%, 65-75%, 75-85%, 85-95% или 90-100% положений уридина в мРНК согласно представляемому раскрытию являются 5-йодуридином. В некоторых вариантах воплощения изобретения 10%-25%, 15-25%, 25-35%, 35-45%, 45-55%, 55-65%, 65-75%, 75-85%, 85-95% или 90-100% положений уридина в мРНК согласно раскрытию являются 5-метоксиуридином и остаток является N1-метил псевдоуридином. В некоторых вариантах воплощения изобретения 10% 25%, 15-25%, 25-35%, 35-45%, 45-55%, 55-65%, 65-75%, 75-85%, 85-95% или 90-100% положений уридина в мРНК согласно представленному раскрытию являются 5-йодуридином и остаток является N1-метил псевдоуридином.

[333] В некоторых вариантах воплощения изобретения мРНК включает по меньшей мере один UTR от экспрессируемой мРНК млекопитающих, такой как конститутивно экспрессируемая мРНК. мРНК считается конститутивно экспрессируемой у млекопитающих, если она непрерывно транскрибируется по меньшей мере в одной ткани здорового взрослого млекопитающего. В некоторых вариантах воплощения изобретения мРНК включает 5' UTR, 3' UTR, или 5' и 3' UTR от РНК, экспрессируемой у млекопитающих, такой как конститутивно экспрессируемая мРНК млекопитающих. мРНК актина является примером конститутивно экспрессируемой мРНК.

[334] В некоторых вариантах воплощения изобретения мРНК включает по меньшей мере один UTR от гидроксистероид 17- бета дегидрогеназы 4 (HSD17B4 или HSD), например, 5' UTR от HSD. В некоторых вариантах воплощения изобретения мРНК включает по меньшей мере один UTR от мРНК глобина, например, мРНК человеческого альфа-глобина (HBA), мРНК человеческого бета глобина (HBB), или мРНК бета глобина *Xenopus laevis* (XBG). В некоторых вариантах воплощения изобретения мРНК включает 5' UTR, 3' UTR или 5' и 3' UTR от мРНК глобинов, таких как HBA, HBB, или XBG. В

некоторых вариантах воплощения изобретения мРНК включает 5' UTR гормона роста крупного рогатого скота, вируса цитомегалии (CMV), мышинового Hba-al, HSD, гена альбумина, HBA, HBB или XBG. В некоторых вариантах воплощения изобретения мРНК включает 3' UTR гормона роста крупного рогатого скота, вируса цитомегалии, мышинового Hba-al, HSD, гена альбумина, HBA, HBB или XBG. В некоторых вариантах воплощения изобретения мРНК включает 5' и 3' UTR гормона роста крупного рогатого скота, вируса цитомегалии, мышинового Hba-al, HSD, гена альбумина HBA, HBB, XBG, белка теплового шока 90 (Hsp90), глицеральдегид 3 - фосфат дегидрогеназы (GAPDH), бета-актина, альфа-тубулина, опухолевого белка (p53) или рецептора эпидермального фактора роста (EGFR).

[335] В некоторых вариантах воплощения изобретения мРНК включает 5' и 3' UTR, которые включены из того же самого источника, например, конститутивно экспрессируемой мРНК актина, альбумина или глобинов, таких как HBA, HBB или XBG.

[336] В некоторых вариантах воплощения изобретения мРНК не включает 5' UTR, например, нет никаких дополнительных нуклеотидов между 5' кэпом и старт кодоном. В некоторых вариантах воплощения изобретения мРНК включает последовательность Kozak (представлена ниже) между 5' кэпом и старт кодоном, но не включает никаких дополнительных 5' UTR. В некоторых вариантах воплощения изобретения мРНК не включает 3' UTR, например, нет никаких дополнительных нуклеотидов между стоп кодоном и поли-А-хвостом.

[337] В некоторых вариантах воплощения изобретения мРНК включает последовательность Kozak. Последовательность Kozak может влиять на инициацию трансляции и общий выход полипептида, транслированного с мРНК. Последовательность Kozak включает кодон метионина, который может функционировать как старт кодон. Минимальной последовательностью Kozak является NNNRUGN, в которой по меньшей мере реализовано одно из следующих положений: первый N является A или G, и второй N является G. В данном контексте последовательность нуклеотида R означает пурин (A или G). В некоторых вариантах воплощения изобретения последовательностями Kozak являются RNNRUGN, NNNRUGG, RNNRUGG, RNNAUGN, NNNAUGG, или RNNAUGG. В некоторых вариантах воплощения изобретения последовательностью Kozak является gccRUGg с нулевыми несоответствиями или с до одного или двух несоответствий к положениям, обозначенным строчными буквами. В некоторых вариантах воплощения изобретения последовательность Kozak-gccAUGg с нулевыми несоответствиями или с до одного или двух несоответствий к положениям, обозначенным строчными буквами. В некоторых вариантах воплощения изобретения последовательность Kozak является gccRccAUGG (SEQ ID №: 277) с нулевыми несоответствиями или с до одного, двух или трех несоответствий в положениях, обозначенных строчными буквами. В некоторых вариантах воплощения изобретения последовательность Kozak-gccAccAUG с нулевыми несоответствиями или с до одного, двух, трех или четырех несоответствий в положениях, которые обозначены строчными символами. В некоторых вариантах воплощения изобретения последовательностью Kozak является GCCACCAUG. В некоторых вариантах

воплощения изобретения последовательностью Kozak является gscgccRccAUGG (SEQ ID №: 278) с нулевыми несоответствиями или с до одного, двух, трех или четырех несоответствий в положениях, обозначенных строчными буквами.

[338] В некоторых вариантах воплощения изобретения мРНК, содержащая ORF, кодирующую агент, связывающий РНК гид с ДНК включает по меньшей мере 90% идентичности к SEQ ID №: 1, необязательно отличающуюся тем, что ORF SEQ ID №: 1 (то есть, SEQ ID №: 204), заменена на альтернативную ORF любого из SEQ ID №: 210, 214, 215, 223, 224, 250, 252, 254, 265 или 266.

[339] В некоторых вариантах воплощения изобретения мРНК, содержащая ORF, кодирующую агент, связывающий РНК гид с ДНК, включает последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности к SEQ ID №:244, необязательно отличающуюся тем, что ORF SEQ ID №: 244 (то есть, SEQ ID №: 204), заменена на альтернативную ORF любого из SEQ ID №: 210, 214, 215, 223, 224, 250, 252, 254, 265 или 266.

[340] В некоторых вариантах воплощения изобретения мРНК, содержащая ORF, кодирующую агент, связывающий РНК гид с ДНК, включает последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности к SEQ ID №:256, необязательно отличающейся тем, что ORF SEQ ID №: 256 (то есть, SEQ ID №: 204), заменена на альтернативную ORF любого из SEQ ID №: 210, 214, 215, 223, 224, 250, 252, 254, 265 или 266.

[341] В некоторых вариантах воплощения изобретения мРНК, содержащая ORF, кодирующую агент, связывающий РНК гид с ДНК, содержит последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности к SEQ ID №:257, необязательно отличающейся тем, что ORF SEQ ID №: 257 (то есть, SEQ ID №: 204), заменена на альтернативную ORF любого из SEQ ID №: 210, 214, 215, 223, 224, 250, 252, 254, 265 или 266.

[342] В некоторых вариантах воплощения изобретения мРНК, содержащая ORF, кодирующую агент, связывающий РНК гид с ДНК, содержит последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности к SEQ ID №:257, необязательно отличающейся тем, что ORF SEQ ID №:258 (то есть, SEQ ID №: 204), заменена на альтернативную ORF любого из SEQ ID №: 210, 214, 215, 223, 224, 250, 252, 254, 265 или 266.

[343] В некоторых вариантах воплощения изобретения мРНК, содержащая ORF, кодирующую агент, связывающий РНК гид с ДНК, содержит последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности к SEQ ID №:259, необязательно отличающейся тем, что ORF SEQ ID №: 259 (то есть, SEQ ID №:204), заменена на альтернативную ORF любого из SEQ ID №: 210, 214, 215, 223, 224, 250, 252, 254, 265, или 266.

[344] В некоторых вариантах воплощения изобретения мРНК, содержащая ORF, кодирующую агент, связывающий РНК гид с ДНК, содержит последовательность,

имеющую по меньшей мере 90% идентичности к SEQ ID №:260, необязательно отличающуюся тем, что ORF SEQ ID №: 260 (то есть, SEQ ID №:204), заменена на альтернативную ORF любого из SEQ ID №: 210, 214, 215, 223, 224, 250, 252, 254, 265 или 266.

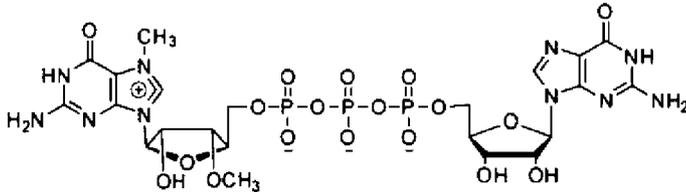
[345] В некоторых вариантах воплощения изобретения мРНК, содержащая ORF, кодирующую агент связывающий РНК гид с ДНК, содержит последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности к SEQ ID №: 261, необязательно отличающейся тем, что ORF SEQ ID №: 261 (то есть, SEQ ID №: 204), заменен на альтернативную ORF любого из SEQ ID №: 210, 214, 215, 223, 224, 250, 252, 254, 265 или 266.

[346] В некоторых вариантах воплощения изобретения, степень идентичности к необязательно заменяемым последовательностям SEQ ID № 243, 244, или 256-261 составляет 95%. В некоторых вариантах воплощения изобретения степень идентичности к необязательно заменяемым последовательностям SEQ ID № 243, 244, или 256-261 составляет 98%. В некоторых вариантах воплощения изобретения степень идентичности к необязательно заменяемым последовательностям SEQ ID № 243, 244, или 256-261 составляет 99%. В некоторых вариантах воплощения изобретения степень идентичности к необязательно заменяемым последовательностям SEQ ID № 243, 244, или 256-261 составляет 100%.

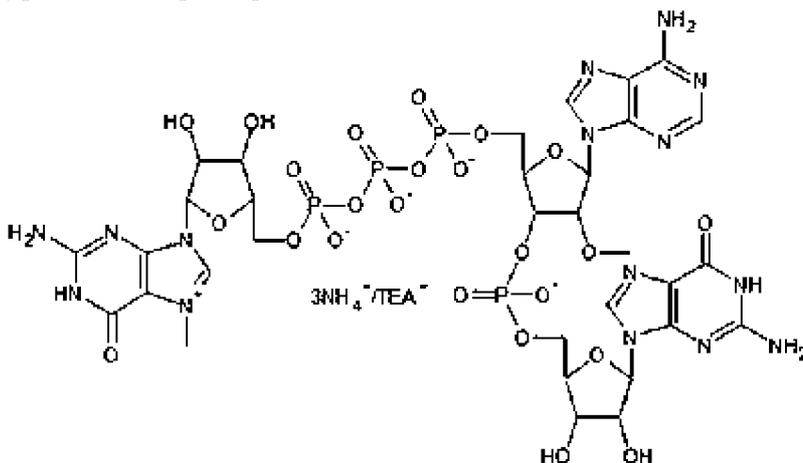
[347] В некоторых вариантах воплощения изобретения, раскрываемая в этом документе мРНК включает 5' кэпы, такие как Cap0, Cap1 или Cap2. 5' кэпом обычно является рибонуклеотид 7-метилгуанин (который может быть дополнительно модифицирован, как обсуждено ниже, например, относительно ARCA), связанный через 5'-трифосфат с 5' положениями первого нуклеотида от 5' к 3' цепи мРНК, то есть, с первым ближайшим кэпом нуклеотида. В Cap0 рибозы первого и второго ближайших кэпов нуклеотидов мРНК оба включают 2'-гидроксил. В Cap1 рибозы первого и второго транскрибированных нуклеотида мРНК включают 2'-метокси- и 2'-гидрокси-соответственно. В Cap2 рибозы первого и второго ближайших кэпа нуклеотидов мРНК оба включают 2'-метокси. Смотрите, например, Katibah et al. (2014) *Proc Natl Acad Sci USA* 111(33): 12025-30; Abbas et al. (2017) *Proc Natl Acad Sci USA* 114(11):E2106-E2115. Наиболее высокого порядка эндогенная мРНК эукариотов, включая мРНК млекопитающих, такие как мРНК человека, включают Cap1 или Cap2. Cap0 и другие структуры кэпа, отличающиеся от Cap1 и Cap2, могут быть иммуногенными для млекопитающих, в частности для человека, вследствие их распознавания как «чужеродных» компонентами врожденной иммунной системы, такими как IFIT-1 и IFIT-5, что может привести к повышению уровней цитокина, включая интерферон типа I. Компоненты врожденной иммунной системы, такие как IFIT-1 и IFIT-5 могут также конкурировать с eIF4E за связывание мРНК с кэпом, кроме Cap1 или Cap2, потенциально ингибируя трансляцию мРНК.

[348] Кэп может включаться совместно с транскрипцией. Например, ARCA (аналог антиреверсного кэпа; Thermo Fisher Scientific Каталожный № AM8045) является аналогом

кэпа, который включает 7-метилгуанин 3'-метокси-5'-трифосфат, связанный по 5' положением с рибонуклеотидом гуанином, который может быть включен *in vitro* в транскрипт при инициации. ARCA получен из кэпа Cap0, в котором в 2' положении первого ближайшего нуклеотида кэпа является гидроксил. Смотрите, например, Stepinski et al., (2001) «Synthesis and properties of mRNAs containing the novel 'antireverse' cap analogs 7-methyl(3'-O-methyl)GpppG and 7-methyl(3'deoxy)GpppG», *RNA* 7: 1486-1495. Структура ARCA представлена ниже.



[349] Могут использоваться Clean Cap™ AG (m7G (5') ppp (5') (2'OMeA) pG; TriLink Biotechnologies, каталожный №. N-7113) или Clean Cap™ GG (m7G(5')ppp(5')(2'OMeG)pG; TriLink Biotechnologies, каталожный № N-7133) для обеспечения ко-транскрипционной структуры кэп 1. 3'-О-метилованная версия Clean Cap™ AG и Clean Cap™ GG также доступны из TriLink Biotechnologies, каталожные номера: N-7413 и N-7433, соответственно. Структура Clean Cap™ представлена ниже.



[1] Альтернативно, кэп может быть внесен к РНК после транскрипции. Например, коммерчески доступен фермент кэпирующий вакцину (New England Biolabs, каталожный № M2080S), который обладает РНК трифосфотазной и гуанилтрансферазной активностями, обеспечиваемые ее субъединицей D1, и метилтрансферазой гуанина, обеспечиваемой ее субъединицей D12. Также, можно внести 7-метилгуанин к РНК, чтобы обеспечить Cap0, в присутствии S-аденозил метионина и ГТФ. Смотрите, например, Guo, P. and Moss, B. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 4023-4027; Mao, X. and Shuman, S. (1994) *J. Biol. Chem.* 269, 24472-24479. Для дополнительного обсуждения кэпов и подходов кэпирования смотрите, например, WO2017/053297 и Ishikawa et al., *Nacl. Acids. Symp. Ser.* (2009) No. 53, 129-130.

[2] В некоторых вариантах воплощения изобретения мРНК дополнительно включает полиаденилированный хвост (поли-А). В некоторых вариантах воплощения изобретения хвост (поли-А) включает по меньшей мере 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100 аденинов,

необязательно до 300 аденинов. В некоторых вариантах воплощения изобретения хвост (поли-А) включает 95, 96, 97, 98, 99 или 100 адениновых нуклеотидов. В некоторых случаях, хвост (поли-А) является «оборванным» одним или более неадениновыми нуклеотидами «якоря» в одной или более позициях хвоста поли-А. Хвосты поли-А могут включать по меньшей мере 8 последовательных адениновых нуклеотидов, но также включать один или более неадениновых нуклеотидов. В контексте данного документа термин «неадениновые нуклеотиды» относится к любым природным или искусственным нуклеотидам, которые не включают аденин. Гуанин, тимин и цитозин являются иллюстративными неадениновыми нуклеотидами. Таким образом, хвосты поли-А на мРНК, представленные в этом документе, могут включать последовательные адениновые нуклеотиды, локализованные на 3' для нуклеотидов, кодирующих агент, связывающий РНК гид с ДНК или исследуемую последовательность. В некоторых случаях, хвосты поли-А на мРНК включают непоследовательные адениновые нуклеотиды, локализованные на 3' для нуклеотидов, кодирующих агент, связывающий РНК гид с ДНК или исследуемые последовательности, в которых неадениновые нуклеотиды прерывают адениновые нуклеотиды на регулярных или нерегулярно отдельных интервалах.

[3] В некоторых вариантах воплощения изобретения один или более неадениновых нуклеотидов локализованы для прерывания последовательных адениновых нуклеотидов таким образом, чтобы белок, связывающий поли-А мог связаться по всей длине с последовательными адениновыми нуклеотидами. В некоторых вариантах воплощения изобретения один или более неадениновых нуклеотидов расположены после по меньшей мере 8, 9, 10, 11 или 12 последовательных адениновых нуклеотидов. В некоторых вариантах воплощения изобретения один или более неадениновых нуклеотидов расположены по меньшей мере после 8-50 последовательных адениновых нуклеотидов. В некоторых вариантах воплощения изобретения один или более неадениновых нуклеотидов локализованы по меньшей мере после 8-100 последовательных адениновых нуклеотидов. В некоторых вариантах воплощения изобретения неадениновый нуклеотид локализован после одного, двух, трех, четырех, пяти, шести или семи адениновых нуклеотидов и сопровождается по меньшей мере 8 последовательными адениновыми нуклеотидами.

[4] Хвост поли-А может включать одну логичную последовательность адениновых нуклеотидов, сопровождаемых одним или более неадениновыми нуклеотидами, необязательно сопровождаемыми дополнительными адениновыми нуклеотидами.

[5] В некоторых вариантах воплощения изобретения хвост поли-А включает или содержит один неадениновый нуклеотид или один логический ряд из 2-10 неадениновых нуклеотидов. В некоторых вариантах воплощения изобретения неадениновый нуклеотид (ы) локализованы после, по меньшей мере, 8, 9, 10, 11, или 12 логических адениновых нуклеотидов. В некоторых случаях, один или более неадениновых нуклеотидов локализованы по меньшей мере после 8-50 логических адениновых нуклеотидов. В некоторых вариантах воплощения изобретения, один или более неадениновых нуклеотидов локализованы после по меньшей мере 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23,

24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 или 50 логических адениновых нуклеотидов.

[6] В некоторых вариантах воплощения изобретения неадениновым нуклеотидом является гуанин, цитозин или тимин. В некоторых случаях, неадениновым нуклеотидом является нуклеотид гуанина. В некоторых вариантах воплощения изобретения неадениновым нуклеотидом является цитозинотый нуклеотид. В некоторых вариантах воплощения изобретения неадениновым нуклеотидом является нуклеотид тимина. В некоторых случаях, когда присутствует больше чем один неадениновый нуклеотид, неадениновый нуклеотид может быть выбран из: а) нуклеотидов гуанина и тимина; б) нуклеотидов гуанина и цитозина; с) нуклеотидов тимина и цитозина; или d), нуклеотидов гуанина, тимина и цитозина. Иллюстративный хвост, включающий поли-А неадениновые нуклеотиды, предоставлен как SEQ ID №: 4.

[7] В некоторых вариантах воплощения изобретения мРНК дополнительно включает полиаденилированный (поли-А) хвост. В некоторых случаях, хвост (поли-А) является «оборванным» одним или более неадениновыми нуклеотидами «якоря» в одной или более позициях в структуре хвоста поли-А. Хвосты поли-А могут включать по меньшей мере 8 последовательных адениновых нуклеотидов, но также включать один или более неадениновых нуклеотидов. В контексте данного документа термин «неадениновые нуклеотиды» относится к любым природным или искусственным нуклеотидам, которые не включают аденин. Гуанин, тимин и цитозинотые нуклеотиды являются иллюстративными неадениновыми нуклеотидами. Таким образом, хвосты поли-А на мРНК, представленные в этом документе, могут включать последовательные адениновые нуклеотиды, локализованные на 3' для нуклеотидов, кодирующих агент, связывающий РНК гид с ДНК или исследуемую последовательность. В некоторых случаях, хвосты поли-А на мРНК включают непоследовательные адениновые нуклеотиды, локализованные на 3' для нуклеотидов, кодирующих агент, связывающий РНК гид с ДНК, или исследуемые последовательности, в которых неадениновые нуклеотиды прерывают адениновые нуклеотиды на регулярных или нерегулярно отдельных интервалах.

[8] В некоторых вариантах воплощения изобретения один или более неадениновых нуклеотидов локализованы для прерывания логических адениновых нуклеотидов таким образом, чтобы белок, связывающий поли-(А) мог связаться по всей длине с последовательными адениновыми нуклеотидами. В некоторых вариантах воплощения изобретения один или более неадениновых нуклеотидов расположены после по меньшей мере 8, 9, 10, 11, или 12 последовательных адениновых нуклеотидов. В некоторых вариантах воплощения изобретения один или более неадениновых нуклеотидов расположены по меньшей мере после 8-50 последовательных адениновых нуклеотидов. В некоторых вариантах воплощения изобретения один или более неадениновых нуклеотидов локализованы по меньшей мере после 8-100 последовательных адениновых нуклеотидов. В некоторых вариантах воплощения изобретения неадениновый нуклеотид локализован после одного, двух, трех, четырех, пяти, шести или семи адениновых нуклеотидов и

сопровождается по меньшей мере 8 последовательными адениновыми нуклеотидами.

[9] Хвост поли-А в настоящем изобретении может включать одну логичную последовательность адениновых нуклеотидов, сопровождаемых одним или более неадениновыми нуклеотидами, необязательно сопровождаемыми дополнительными адениновыми нуклеотидами.

[10] В некоторых вариантах воплощения изобретения хвост поли-А включает или содержит один неадениновый нуклеотид или один логический ряд из 2-10 неадениновых нуклеотидов. В некоторых вариантах воплощения изобретения неадениновый нуклеотид (ы) локализованы после по меньшей мере 8, 9, 10, 11, или 12 логических адениновых нуклеотидов. В некоторых случаях, один или более неадениновых нуклеотидов локализованы по меньшей мере после 8-50 логических адениновых нуклеотидов. В некоторых вариантах воплощения изобретения, один или более неадениновых нуклеотидов локализованы после по меньшей мере 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 или 50 логических адениновых нуклеотидов.

[11] В некоторых вариантах воплощения изобретения неадениновым нуклеотидом является гуанин, цитозин, или тимин. В некоторых случаях, неадениновым нуклеотидом является нуклеотид гуанина. В некоторых вариантах воплощения изобретения неадениновым нуклеотидом является цитозинный нуклеотид. В некоторых вариантах воплощения изобретения неадениновым нуклеотидом является нуклеотид тимина. В некоторых случаях, когда присутствует больше чем один неадениновый нуклеотид, неадениновый нуклеотид может быть выбран из: а) нуклеотидов гуанина и тимина; б) нуклеотидов гуанина и цитозина; с) нуклеотидов тимина и цитозина; или d), нуклеотидов гуанина, тимина и цитозина. Иллюстративный хвост, включающий поли-А неадениновые нуклеотиды, предоставлен как SEQ ID №: 4.

```
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGCGAAAAAAAAAAAAAAAAAA
AAAAAAAAAAAAAAAAACCGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
AA.
```

[12] Химические модификации, такие как упомянутые выше могут быть объединены, для обеспечения модифицированных gRNA и/или мРНК, включающих нуклеозиды и нуклеотиды (совместно именуемые как «остатки»), которые могут иметь две, три, четыре, или больше модификаций. Например, у модифицированного остатка могут быть модифицированы сахар и нуклеотидные основания. В некоторых вариантах воплощения изобретения каждое основание gRNA модифицировано, *например*, у всех оснований есть модифицированная фосфатная группа, такая как фосфоротиоатная группа. В определенных вариантах воплощения изобретения все, или почти все группы фосфата молекулы gRNA заменены фосфоротиоатными группами. В некоторых вариантах воплощения изобретения, измененные gRNA включают по меньшей мере один модифицированный остаток в или приблизительно 5' концов РНК. В некоторых вариантах воплощения изобретения, модифицированные gRNA включают по меньшей мере один

модифицированный остаток в или приблизительно 3' концов РНК.

[13] В некоторых вариантах воплощения изобретения gRNA включает один, два, три или больше модифицированных остатков. В некоторых вариантах воплощения изобретения по меньшей мере 5% положений в модифицированной gRNA (*например* по меньшей мере 5%, по меньшей мере 10%, по меньшей мере 15%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 25%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 35%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 45%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или 100%) являются модифицированными нуклеозидами или нуклеотидами.

[14] Не модифицированные нуклеиновые кислоты могут быть склонны к деградации, *например*, внутриклеточными нуклеазами или теми, которые обнаружены в сыворотке. Например, нуклеазы могут гидролизировать фосфодиэфирные связи нуклеиновой кислоты. Соответственно, в одном аспекте gRNA, представленные в этом документе, могут содержать один или более модифицированных нуклеозидов или нуклеотидов, *например*, с учетом стабильности к внутриклеточным нуклеазам или нуклеазам сыворотки. В некоторых вариантах воплощения изобретения, модифицированные молекулы gRNA, представленные в этом документе, могут демонстрировать сниженный врожденный иммунный ответ при их внесении в культуру клеток как *in vivo*, так и *ex vivo*. Термин «врожденный иммунный ответ» включает клеточную реакцию на экзогенные нуклеиновые кислоты, в т.ч. одноцепочечные нуклеиновые кислоты, что сопровождается индукцией экспрессии и высвобождением цитокина, особенно интерферонов и гибелью клетки.

[15] В некоторых вариантах воплощения изобретения при модификации остова фосфатная группа модифицированного остатка может быть модифицирована заменой одного или более кислородов другим заместителем. Далее, модифицированный остаток, *например*, модифицированный остаток, представленный в модифицированной нуклеиновой кислоте, может включать общую замену не модифицированного фосфатного остатка на модифицированные фосфатные группы, представленные в этом документе. В некоторых вариантах воплощения изобретения модификация остова фосфата может включать альтерации, которые представлены одним неизменным линкером или измененным линкером с асимметричным распределением изменения.

[16] Примеры модифицированных фосфатных групп включают, фосфоротиоаты, фосфороселенаты, борофосфаты, сложные эфиры борофосфата, гидроден фосфонаты, фосфоамидаты, алкилированные или арилзамещенные фосфонаты и фосфотриэфиры. Атом фосфора в немодифицированной фосфатной группе является ахиральным. Однако замена одного из несвязанных кислородов на один из вышеупомянутых атомов или группу атомов может превращать атом фосфора в хиральный. Стереогенный атом фосфора может обладать или «R» конфигурацией (в данном документе Rp) или «S» конфигурацией (в данном документе Sp). Остов также может быть модифицирован заменой соединений

кислорода, (*то есть*, кислорода, который связывает фосфат с нуклеозидом), азотом (соединения фосфоамидатов), серой (соединения фосфоротиоаты) и углеродом (соединения метиленфосфонаты). Замена может встречаться с одним сцепленным кислородом или с двумя сцепленными кислородами.

[17] Фосфатная группа может быть заменена не-фосфоросодержащими коннекторами при специфических модификациях остова. В некоторых вариантах воплощения изобретения сопряженная фосфатная группа может быть заменена нейтральным остатком. Примеры остатков, которые могут заменить фосфатную группу могут включать, но не ограничиваются, *например*, метил фосфонат, гидроксиламино, силооксанат, карбонат, карбоксиметил, карбамаат, амид, тиоэфир, этиленоксидный линкер, сульфонат, сульфонамид, тиоформацетал, формацетал, оксим, метиленимино, метиленметилямино, метиленгидразо, метилендиметилгидразо и метиленоксиметилямино.

[18] Скаффолды, которые могут мимикрировать нуклеиновые кислоты, отличаются тем, что в конструкции линкер фосфата и сахар рибозы замещается нуклеозидом или суррогатным нуклеотидом, устойчивым к действию нуклеазы. Такие модификации могут включать модификации остова и сахара. В некоторых вариантах воплощения изобретения нуклеотидные основания могут соединять суррогатный остов. Примеры суррогатных нуклеозидов могут включать, но не ограничиваются, морфолино, циклобутил, пирролидин и пептид-нуклеиновую кислоту (PNA).

[19] Модифицированные нуклеозиды и нуклеотиды могут включать одну или более модификаций сахарной группы, *то есть* модификаций сахара. Например, 2' гидроксилы группы (ОН) могут быть модифицированы, *например*, заменены многими вариантами различных заместителей «окси» или «деокси». В некоторых вариантах воплощения изобретения модификации в 2' гидроксильных группах могут повысить стабильность нуклеиновой кислоты, так как гидроксил больше не может депротонироваться с образованием иона 2⁻- алкооксида.

[20] Примеры модификаций 2' гидроксильной группы могут включать алкокси или арилокси (OR, отличающееся тем, что «R» может быть, *например*, алкилом, циклоалкилом, арилом, арилалкилом, гетероарилом или сахаром); полиэтиленгликоли (PEG), O(CH₂CH₂O)_nCH₂CH₂OR, отличающиеся тем, что R может быть, *например*, H или, необязательно, замещенный алкил, где n может быть целым числом от 0 до 20 (*например*, от 0 до 4, от 0 до 8, от 0 до 10, от 0 до 16, от 1 до 4, от 1 до 8, от 1 до 10, от 1 до 16, от 1 до 20, от 2 до 4, от 2 до 8, от 2 до 10, от 2 до 16, от 2 до 20, от 4 до 8, от 4 до 10, от 4 до 16 и от 4 до 20). В некоторых вариантах воплощения изобретения модификациями группы 2' гидроксил могут быть 2'-O-Me. В некоторых вариантах воплощения изобретения модификациями группы 2' гидроксил могут быть 2'-фтор модификации, которые заменяют 2' группы гидроксила фтористым соединением. В некоторых вариантах воплощения изобретения модификации группы 2' гидроксил могут включать «закрытые» нуклеиновые кислоты (LNA), в которых группы 2' гидроксила могут быть связаны, *например*, с алкиленами C₁₋₆ или гетероалкиленами C₁₋₆ с 4' углеродным мостиком рибозы, где иллюстративные связи могут

включать метилен, пропилен, эфир, или amino группы; O-амино (в которой amino может быть, *например*, NH_2 ; алкиламином, диалкиламином, гетероциклилом, ариламином, диариламином, гетероариламином или дигетероариламином, этилендиамином или полиамином) и aminoалкоокси, $\text{O}(\text{CH}_2)_n$ -амино (в которой amino может быть, *например*, NH_2 ; алкиламином, диалкиламином, гетероциклилом, ариламином, диариламином, гетероариламином или диэтероариламином, этилендиамином или полиамином). В некоторых вариантах воплощения изобретения модификации 2' гидроксильной группы могут включать «открытые» нуклеиновые кислоты (UNA), где в кольце рибозы недостаточно связей в C2'-C3'. В некоторых вариантах воплощения изобретения модификации 2' гидроксильной группы могут включать метоксиэтил группу (МОЕ), $(\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_3$, *например*, производную PEG).

[21] Модификации 2' «деокси» могут включать водород (*то есть* деоксирибозные сахара, *например*, в «липких» концах частичного dsRNA); гало (*например*, бром, хлор, фтор, или йод); amino (отличающийся тем, что amino может быть, *например*, NH_2 ; алкиламином, диалкиламином, гетероциклилом, ариламином, диариламином, гетероариламином, диэтероариламином или аминокислотой); $\text{NH}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH})_n\text{CH}_2\text{CH}_2$ -амино (отличающийся тем, что amino может быть, *например*, группой, представленной в данном документе), $\text{NHC}(\text{O})\text{R}$ (отличающийся тем, что R может быть, *например*, алкилом, циклоалкилом, арилом, арилалкилом, гетероариллом или сахаром), циано; меркапто; алкилтио-алкил; тиоалкокси; и алкил, цианоалкил, арил, алкенил и алкинил, которые можно, необязательно, заменить, *например*, amino, как представлено в этом документе.

[22] Модификация сахара может включать сахарную группу, которая может также содержать один или более углеродов, с противоположной стереохимической конфигурацией, отличающейся от соответствующего углерода в рибозе. Таким образом, модифицированная нуклеиновая кислота может также включать нуклеотиды, содержащие *например*, в качестве сахара арабинозу. Модифицированные нуклеиновые кислоты могут также включать сахар, с удаленным основанием. Такой сахар может также дополнительно модифицироваться одним или более атомами сахара. Модифицированные нуклеиновые кислоты могут также включать один или более из сахаров, который находится в L форме, *например*, L- нуклеозиды.

[23] Модифицированные нуклеозиды и нуклеотиды, представленные в этом документе, которые также могут быть включены в модифицированную нуклеиновую кислоту, могут содержать модифицированное основание, также называемое нуклеотидное основание. Примеры нуклеотидных оснований включают, но не ограничены, аденин (A), гуанин (G), цитозин (C) и урацил (U). Эти нуклеотидные основания могут быть модифицированы или полностью заменены, чтобы обеспечить модифицированные остатки, которые могут быть включены в модифицированные нуклеиновые кислоты. Нуклеотидные основания нуклеотида могут быть независимо выбраны из пурина, пиримидина, аналога пурина или аналога пиримидина. В некоторых вариантах воплощения изобретения нуклеотидные основания могут включать, *например*, природные и синтетические

производные основания.

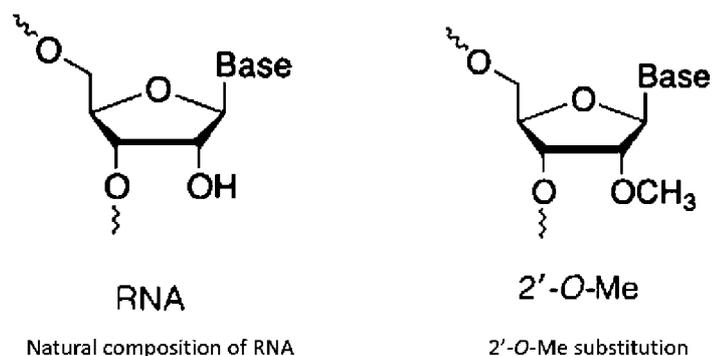
[24] В вариантах воплощения, использующих двойную РНК гид, каждая из crRNA и tracr RNA может содержать модификации. Такие модификации могут быть в одном или обоих концах crRNA и/или в tracr RNA. В вариантах воплощения, включающих sgRNA, могут быть химически модифицированы один или более остатков в одном или обоих концах sgRNA, или вся sgRNA может быть химически модифицирована. Некоторые варианты воплощения изобретения включают модификации 5' конца. Некоторые варианты воплощения изобретения включают модификации 3' конца. В некоторых вариантах воплощения изобретения один или более, или все нуклеотиды в одноцепочечной молекуле РНК гида являются дезоксирибонуклеотидами.

[25] В некоторых вариантах воплощения изобретения РНК гида, раскрытые в этом документе, включают одну из структур модификаций, раскрытых в патенте США 62/431756, поданном 8 декабря 2016 года под названием «Химически модифицированные РНК гид», содержание которого полностью включено в настоящий документ посредством ссылки.

[26] В некоторых вариантах воплощения изобретения, изобретение включает gRNA, содержащую одну или более модификаций. В некоторых вариантах воплощения изобретения модификация включает модифицированный нуклеотид 2'-О-метил (2'-O-Me). В некоторых вариантах воплощения изобретения модификация включает фосфотионатную (PS) связь между нуклеотидами.

[27] Термины «mA», «mC», «mU» или «mG» могут использоваться для обозначения нуклеотида, который модифицирован на 2'-O-Me.

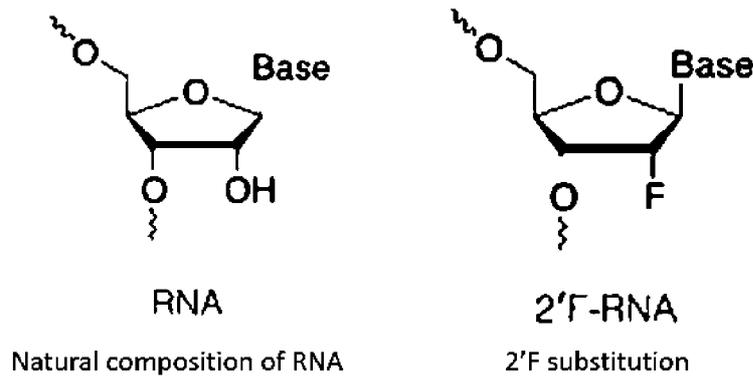
[28] Модификация 2'-O-метил может быть изображена следующим образом:



[29] Другой химической модификацией, которая, как продемонстрировано, влияла на кольца сахара нуклеотида, является замена галогеном. Например, 2'-фтор (2'-F) замена в кольце сахара нуклеотида может повысить аффинность связывания олигонуклеотида и стабильность нуклеазы.

[30] В этой заявке термины «fA», «fC», «fU» или «fG» могут использоваться для обозначения нуклеотида, который заменили на 2'-F.

[31] Замена на 2'-F может быть изображена следующим образом:

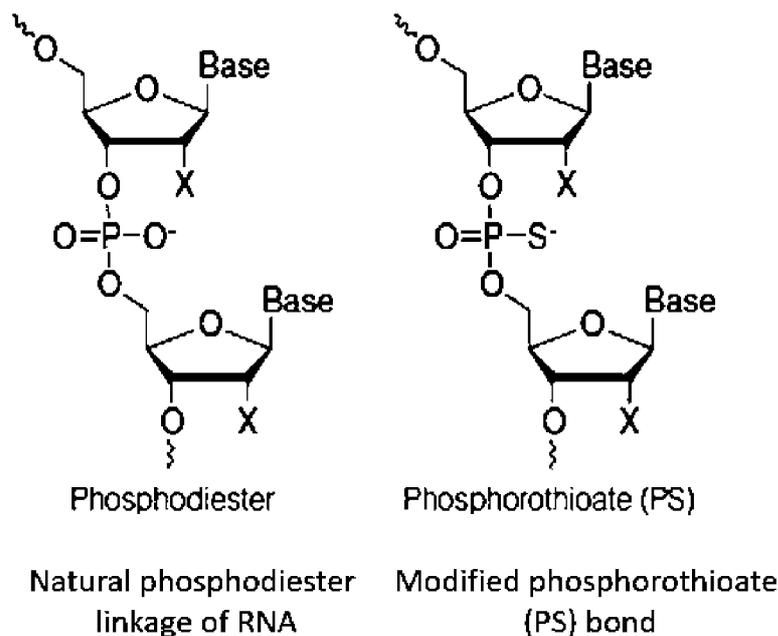


[32] Фосфотионатное (PS) сцепление или связь, относится к связи, в которой сера заменяет один несвязанный кислород фосфата в фосфодиэфирной связи, например в связях между основаниями нуклеотидов. При использовании фосфотионатов для получения олигонуклеотидов, модифицированные олигонуклеотиды могут также упоминаться как S-oligos.

[33] Обозначение «*» может использоваться для отображения PS модификации. Используемые в этой заявке термины A *, C *, U * или G* могут применяться для обозначения нуклеотида, который связан со следующим (например, 3') нуклеотидом через связь PS.

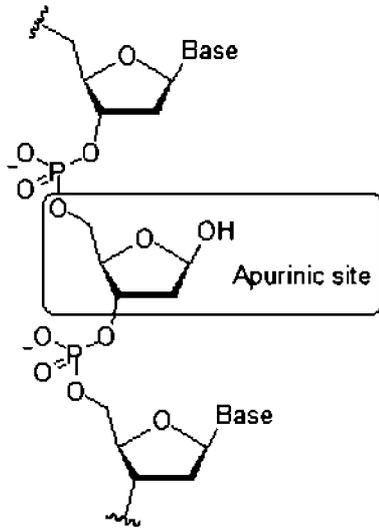
[34] Используемые в этой заявке термины «mA*», «mC*», «mU*» или «mG*» могут использоваться для обозначения заменяемого нуклеотида 2'-O-Me, который связан со следующим (например, 3') нуклеотидом через связь PS.

[35] На диаграмме, представленной ниже, отображена замена S- в несвязанном кислороде фосфата, генерируя связь PS вместо фосфодиэфирной связи:

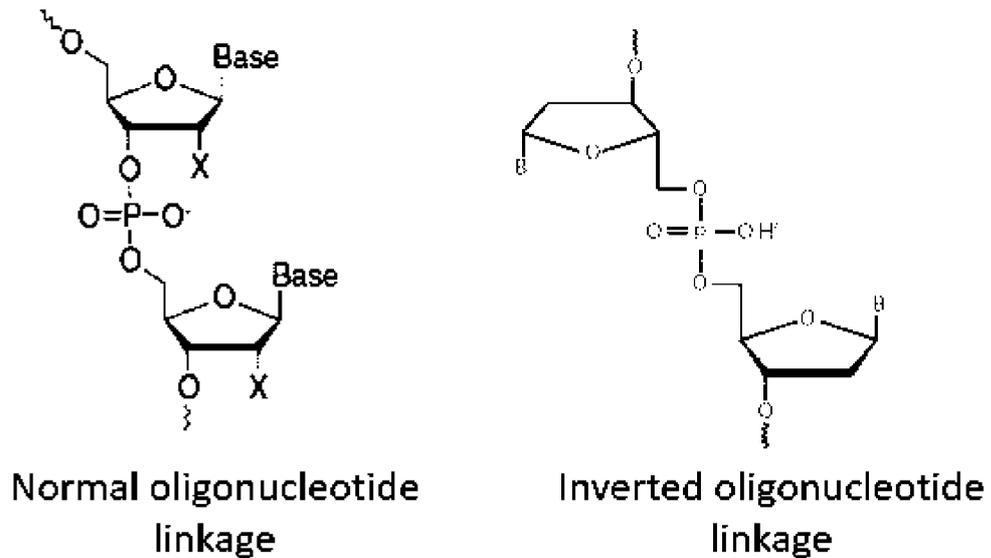


[36] Нуклеотиды с удаленным основанием относятся к нуклеотидам, у которых

отсутствуют азотистые основания. На фигуре, представленной ниже, отображен олигонуклеотид без основания (также известный как апуриновый сайт), в котором удалено основание:



[37] К инвертированным основаниям отнесены основания со связями, которые инвертированы от нормальных 5' к 3' связей (то есть, или 5' к 5' связям или 3' к 3' связям). Например:



[38] Нуклеотид без основания может быть присоединен инвертированной связью. Например, нуклеотид с удаленным основанием, может быть присоединен к терминальным 5' нуклеотидам через 5' к 5' связи, или нуклеотид с удаленным основанием может быть присоединен к терминальным 3' нуклеотидам через 3' к 3' связи. Инвертированный нуклеотид без основания в терминальных 5' или в 3' нуклеотидах может также упоминаться как инвертированный кэп конец без основания.

[39] В некоторых вариантах воплощения изобретения модифицированы один или более из первых трех, четырех, или пяти нуклеотидов в 5' конце, и один или более из

последних трех, четырех или пяти нуклеотидов в 3' конце. В некоторых вариантах воплощения изобретения модификации представлены 2'-О-Ме, 2'-F, инвертированным нуклеотидом без основания, связью PS, или другими известными в данной области современными способами модификации нуклеотидов для повышения стабильности и/или эффективности.

[40] В некоторых вариантах воплощения изобретения первые четыре нуклеотида в 5' конце, и последние четыре нуклеотида в 3' конце связаны фосфотионатной (PS) связью.

[41] В некоторых вариантах воплощения изобретения первые три нуклеотида в 5' конце и последние три нуклеотида в 3' конце являются 2'-О-метил (2'-О-Ме) модифицированным нуклеотидом.

[42] В некоторых вариантах воплощения изобретения первые три нуклеотида в 5' конце и последние три нуклеотида в 3' конце включают 2'-фтор (2'-F) модифицированный нуклеотид. В некоторых вариантах воплощения изобретения первые три нуклеотида в 5' конце и последние три нуклеотида в 3' конце включают инвертированный нуклеотид без основания.

[43] В некоторых вариантах воплощения изобретения РНК гид включает модифицированную sgRNA. В некоторых вариантах воплощения изобретения sgRNA включает модифицированную структуру, представленную в SEQ ID № 3, где N является любым естественным или искусственным нуклеотидом, и где все N включают последовательность гида, которая ориентирует нуклеазу к таргетной последовательности. В некоторых вариантах воплощения изобретения РНК гид включает sgRNA, представленную в любом из SEQ ID №: 87-124. В некоторых вариантах воплощения изобретения РНК гид включает sgRNA, содержащую любую из последовательностей гида SEQ ID №: 5-82 и нуклеотиды SEQ ID №: 125, отличающуюся тем, что SEQ ID №: 125 находятся на 3' конце последовательности гида, и отличающуюся тем, что последовательность гида может быть модифицирована, как показано в SEQ ID №: 3.

Рибонуклеопротеиновый комплекс

[44] В некоторых вариантах воплощения изобретения, композиция представлена одной или более gRNA, включающих одну или более последовательностей гида из Таблицы 1 или одну или более sgRNA из Таблицы 2 и агент, связывающий РНК гид с ДНК, например, нуклеазу, такую как нуклеаза Cas, такую как Cas 9. В некоторых вариантах воплощения изобретения агент, связывающий РНК гид с ДНК, характеризуется расщепляющей активностью, которая может также упоминаться как эндонуклеазная активность двойного разрыва. В некоторых вариантах воплощения изобретения агент, связывающий РНК гид с ДНК, включает нуклеазу Cas. Примеры нуклеаз Cas9 включают таковые из типа II системы CRISPR *S. pyogenes*, *S. aureus* и других прокариотов (смотрите, например, перечень в следующем параграфе), и ее модифицированные (например, гибридные или мутантные) версии. См., например, патент США 2016/0312198 A1; 2016/0312199 A1. Другие примеры нуклеаз Cas включают комплекс Csm или Cmr типа III системы CRISPR или Cas 10, или их субъединицы Csm 1, или Cmr 2; и каскадный комплекс типа I система CRISPR, или их

субъединицы Cas3. В некоторых вариантах воплощения изобретения нуклеаза Cas может быть из системы Типа IIA, Типа IIB, или Типа IIC. Для обсуждения различных систем CRISPR и нуклеаз Cas, смотрите, например, публикации: Makarova et al., NAT. REV. MICROBIOL. 9:467-477 (2011); Makarova et al., NAT. REV. MICROBIOL. 13: 722-36 (2015); Shmakov et al., MOLECULAR CELL, 60:385-397 (2015).

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

[46] В некоторых вариантах воплощения изобретения нуклеаза Cas является нуклеазой Cas9 из *Streptococcus pyogenes*. В некоторых вариантах воплощения изобретения нуклеаза Cas является нуклеазой Cas9 из *Streptococcus thermophilus*. В некоторых вариантах воплощения изобретения нуклеаза Cas является нуклеазой Cas9 из *Neisseria meningitidis*. В некоторых вариантах воплощения изобретения нуклеаза Cas является нуклеазой Cas9 из *Staphylococcus aureus*. В некоторых вариантах воплощения изобретения нуклеаза Cas является нуклеазой Cpf1 из *Francisella novicida*. В некоторых вариантах воплощения изобретения нуклеаза Cas является нуклеазой Cpf1 из *Acidaminococcus sp.* В некоторых вариантах воплощения изобретения нуклеаза Cas является нуклеазой Cpf1 из бактерии *Lachnospiraceae* ND2006. В дальнейших вариантах воплощения нуклеаза Cas является нуклеазой Cpf1 из *Francisella tularensis*, бактерии *Lachnospiraceae*, *Butyrivibrio proteoclasticus*, бактерии *Peregrinibacteria*, бактерии *Parcubacteria*, *Smithella*, *Acidaminococcus*, *Candidatus Methanoplasma termitum*, *Eubacterium eligens*, *Moraxella*

bovoculi, *Leptospira inadai*, *Porphyromonas crevioricanis*, *Prevotella disiens*, или *Porphyromonas macacae*. В некоторых вариантах воплощения нуклеаза Cas является нуклеазой *Cpf1* из *Acidaminococcus* или *Lachnospiraceae*.

[47] В некоторых вариантах воплощения изобретения gRNA вместе с агентом, связывающим РНК гид с ДНК, называют рибонуклеопротеиновым комплексом (RNP). В некоторых вариантах воплощения изобретения агент, связывающий РНК гид с ДНК является нуклеазой Cas. В некоторых вариантах воплощения изобретения gRNA вместе с нуклеазой Cas называют Cas RNP. В некоторых вариантах воплощения изобретения RNP включает Тип I, Тип II или Тип III компоненты. В некоторых вариантах воплощения изобретения нуклеаза Cas является белком Cas9 из Типа II системы CRISPR/Cas. В некоторых вариантах воплощения изобретения gRNA вместе с Cas9 называют Cas9 RNP.

[48] У «дикого» типа Cas9 есть два нуклеазных домена: RuvC и HNH. Домен RuvC расщепляет нетаргетную цепь ДНК, и домен HNH расщепляет таргетную цепь ДНК. В некоторых вариантах воплощения изобретения белок Cas9 включает более чем один домен RuvC и/или более одного домена HNH. В некоторых вариантах воплощения изобретения белок Cas9 является «диким» типом Cas9. В каждой композиции и способе, используемых в вариантах воплощения изобретения, Cas вызывает разрыв двойной нити в таргетной ДНК.

[49] У «дикого» типа Cas9 есть два нуклеазных домена: RuvC и HNH. Домен RuvC расщепляет нетаргетную цепь ДНК, и домен HNH расщепляет таргетную цепь ДНК. В некоторых вариантах воплощения изобретения белок Cas9 включает более одного домена RuvC и/или более одного домена HNH. В некоторых вариантах воплощения изобретения белок Cas9 является «диким» типом Cas9. В некоторых вариантах воплощения изобретения Cas9 способен индуцировать разрыв двойной нити в таргетной ДНК. В некоторых вариантах воплощения изобретения нуклеаза Cas может расщеплять dsDNA, она может расщепить одну цепь dsDNA, или она, возможно, не обладает ДНК расщепляющей или никазой активностями. Иллюстративная последовательность аминокислот Cas9 предоставлена как SEQ ID №: 203. Иллюстративная мРНК Cas9, последовательность ORF, которая включает старт и стоп кодоны представлены SEQ ID №: 204. Иллюстративная мРНК Cas9 кодирующая последовательность, способная включаться в рекомбинантный белок, представлена как SEQ ID №: 210.

[50] В некоторых вариантах воплощения изобретения используются химерные нуклеазы Cas, в которых один домен или фрагмент белка заменены частью другого белка. В некоторых вариантах воплощения изобретения домен нуклеазы Cas может быть заменен доменом от другой нуклеазы, такой как Fok I. В некоторых вариантах воплощения изобретения нуклеаза Cas может быть модифицированной нуклеазой.

[51] В других вариантах воплощения изобретения нуклеаза Cas может быть из Типа I системы CRISPR/Cas. В некоторых вариантах воплощения изобретения нуклеаза Cas может быть компонентом каскадного комплекса Типа I системы CRISPR/Cas. В некоторых вариантах воплощения изобретения нуклеаза Cas может быть белком Cas3. В некоторых вариантах воплощения изобретения нуклеаза Cas может быть от Типа III системы

CRISPR/Cas. В некоторых вариантах воплощения изобретения нуклеаза Cas может обладать активностью расщепления РНК.

[52] В некоторых вариантах воплощения изобретения агент, связывающий РНК гид с ДНК, обладает одноцепочечной нуклеазной активностью, то есть, может расщепить одну нить ДНК, чтобы получить однонитевой разрыв, также известный как «ник». В некоторых вариантах воплощения изобретения агент, связывающий РНК гид с ДНК, включает Cas нуклеазу. Никаза является ферментом, который создает однонитевой разрыв в dsDNA, то есть, расщепляет одну нить, но не другую нить двойной цепи ДНК. В некоторых вариантах воплощения изобретения Cas никаза является версией нуклеазы Cas (например, нуклеаза Cas, обсужденная выше), в которой инактивирован сайт, обладающий эндонуклеазной активностью, например, одной или более альтерациями (например, точечные мутации) в каталитическом домене. Смотрите, например, патент США № 8889356 для обсуждения Cas никаза и иллюстративных каталитических альтераций в домене. В некоторых вариантах воплощения изобретения Cas никаза, такая как Cas9 никаза, включает инактивированный RuvC или HNH домен. Иллюстративная аминокислотная последовательность Cas9 никаза представлена как SEQ ID №: 206. Иллюстративная мРНК Cas9 никаза и последовательность ORF, которая включает старт и стоп кодоны, представлены как SEQ ID №: 207. Иллюстративная мРНК Cas9 никаза, кодирующая последовательность, способную включаться в рекомбинантный белок, представлена как SEQ ID №: 211.

[53] В некоторых вариантах воплощения изобретения агент, связывающий РНК гид с ДНК, модифицирован и включает только один функциональный домен нуклеазы. Например, белок агента может быть модифицирован таким образом, что один из доменов нуклеазы является мутированным, либо удаленным частично или полностью, чтобы снизить ее расщепляющую активность относительно нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах воплощения изобретения применяется никаза, в которой домен RuvC характеризуется сниженной активностью. В некоторых вариантах воплощения изобретения применяется никаза, в которой неактивен домен RuvC. В некоторых вариантах воплощения изобретения применяется никаза, в которой домен HNH обладает сниженной активностью. В некоторых вариантах воплощения изобретения используется никаза с неактивным доменом HNH.

[54] В некоторых вариантах воплощения изобретения заменена консервативная аминокислота в белке домена нуклеазы Cas, чтобы уменьшить или изменить активность нуклеазы. В некоторых вариантах воплощения изобретения нуклеаза Cas может включать замену аминокислоты в RuvC или RuvC-подобном домене нуклеазы. Иллюстративные замены аминокислоты в RuvC или RuvC-подобном домене нуклеазы включают D10A (на основе белка Cas9 из *S. pyogenes*). Смотрите, например, Zetsche et al. (2015) *Cell* Oct 22:163(3): 759-771. В некоторых вариантах воплощения изобретения нуклеаза Cas может включить замену аминокислоты в HNH или HNH-подобном домене нуклеазы. Иллюстративные замены аминокислоты в HNH или HNH-подобном домене нуклеазы включают E762A, H840A, N863A, H983A, и D986A (на основе белка Cas9 из *S. Pyogenes*)

Смотрите, например, Zetsche с соавторами (2015). Следующие иллюстративные замены аминокислоты включают D917A, E1006A, и D1255A (на основе U112 Cpf1 (FnCpf1 из Francisella novicida) последовательности (UniProtKB-A0Q7Q2) (CPF1_FRATN).

[55] В некоторых вариантах воплощения изобретения мРНК, кодирующая никазу, предоставлена в комбинации с парой РНК гидов, которые соответственно комплементарны к смысловым и антисенсорным цепям целевой последовательности. В этом варианте воплощения РНК гид ориентирует никазу к целевой последовательности и выполняет разрыв DSB на противоположных цепях целевой последовательности (то есть, двойной разрыв). В некоторых вариантах воплощения изобретения использование двойного разрыва может улучшить специфичность и уменьшить нецелевые эффекты. В некоторых вариантах воплощения изобретения никаза используется вместе с двумя отдельными РНК гидами, которые адресованы противоположным цепям ДНК для выполнения двойного разрыва в целевой ДНК. В некоторых вариантах воплощения изобретения никаза используется вместе с двумя отдельными РНК гидами, которые выбраны для непосредственного контакта при выполнении двойного разрыва в целевой ДНК.

[56] В некоторых вариантах воплощения изобретения агент, связывающий РНК гид с ДНК, характеризуется слабой расщепляющей и никазной активностями. В некоторых вариантах воплощения изобретения агент, связывающий РНК гид с ДНК, включает dCas полипептид, связанный с ДНК. dCas полипептид обладает ДНК - связывающей активностью, в то время как его каталитическая активность (эндонуклеаза/никаза) чрезвычайно низкая. В некоторых вариантах воплощения изобретения dCas полипептид является dCas9 полипептидом. В некоторых вариантах воплощения изобретения агент, связывающий РНК гид с ДНК, характеризуется слабой расщепляющей и никазной активностью или dCas полипептид, связывающийся с ДНК, является версией нуклеазы Cas (например, нуклеаза Cas, обсужденная выше), в которой ее эндонуклеотические активные сайты инактивированы, например, одной или более альтерациями (например, точечными мутациями) в ее каталитических доменах. Смотрите, например, патенты США 2014/0186958 A1; 2015/0166980 A1. Иллюстративная аминокислотная последовательность dCas9 предоставлена как SEQ ID №: 208. Иллюстративная последовательность мРНК Cas9 ORF, которая включает старт и стоп кодоны, представлена как SEQ ID №:209. Иллюстративная мРНК Cas9, кодирующая последовательность, требуемая для включения в рекомбинантный белок, представлена как SEQ ID №:212.

[57] В некоторых вариантах воплощения изобретения агент, связывающий РНК гид с ДНК, включает один или более гетерологичных функциональных доменов (например, является или включает рекомбинантный полипептид).

[58] В некоторых вариантах воплощения изобретения гетерологичный функциональный домен может способствовать перемещению агента, связывающего РНК гид с ДНК, в ядро клетки. Например, гетерологичный функциональный домен может быть сигналом ядерной локализации (NLS). В некоторых вариантах воплощения изобретения агент, связывающий РНК гид с ДНК, может быть гибридизирован с 1-10 NLS. В некоторых

вариантах воплощения изобретения агент, связывающий РНК гид с ДНК, может быть гибридизирован с 1-5 NLS. В некоторых вариантах воплощения изобретения агент, связывающий РНК гид с ДНК, может быть гибридизирован с одним NLS. Если используется один NLS, NLS могут быть связаны в N-сайте или в C-сайте последовательности агента, связывающего РНК гид с ДНК. В некоторых вариантах воплощения изобретения агент, связывающий РНК гид с ДНК, может быть гибридизирован на C- терминальном сайте по меньшей мере с одним NLS. В NLS также может быть вставлена последовательность агента, связывающего РНК гид с ДНК. В других вариантах воплощения изобретения агент, связывающий РНК гид с ДНК, может быть гибридизирован с более чем одной NLS. В некоторых вариантах воплощения изобретения агент, связывающий РНК гид с ДНК, может быть гибридизирован с 2, 3, 4, или 5 NLS. В некоторых вариантах воплощения изобретения агент, связывающий РНК гид с ДНК, может быть гибридизирован с двумя NLS. При определенных обстоятельствах, два NLS могут быть одинаковыми (например, два SV40 NLS) или различными. В некоторых вариантах воплощения изобретения агент, связывающий РНК гид с ДНК, гибридизирован с двумя последовательностями NLS SV40, связанными через карбокси конец. В некоторых вариантах воплощения изобретения, агент, связывающий РНК гид с ДНК, может быть гибридизирован с двумя NLS, один связан в N-терминальном сайте и один в C- терминальном сайте. В некоторых вариантах воплощения изобретения, агент, связывающий РНК гид с ДНК, может быть гибридизирован с 3 NLS. В некоторых вариантах воплощения изобретения агент, связывающий РНК гид с ДНК, может быть гибридизирован без NLS. В некоторых вариантах воплощения изобретения NLS может быть однокомпонентной последовательностью, такой как, *например*, NLS SV40, PKKKRKV (SEQ ID №: 274) или PKKKRRV (SEQ ID №:275). В некоторых вариантах воплощения изобретения NLS может быть двухкомпонентной последовательностью, такой как NLS нуклеоплазмин, KRPAATKKAGQAKKKK (SEQ ID №: 276). В определенном варианте воплощения изобретения одинарная последовательность PKKKRKV (SEQ ID №: 274) NLS может быть связана в C-сайте с агентом, связывающим РНК гид с ДНК. Один или более линкеров необязательно включены на сайте гибридации. В некоторых вариантах воплощения изобретения один или более NLS согласно любому из предшествующих вариантов воплощения присутствуют в агенте, связывающем РНК гид с ДНК в комбинации с одним или более дополнительными гетерологичными функциональными доменами, такими как любой из гетерологичных функциональных доменов, представленных ниже.

[59] В некоторых вариантах воплощения изобретения гетерологичный функциональный домен может быть способен модифицировать период внутриклеточного полураспада агента, связывающего РНК гид с ДНК. В некоторых вариантах воплощения изобретения период полураспада агента, связывающего РНК гид с ДНК, может пролонгироваться. В некоторых вариантах воплощения изобретения может быть уменьшен период полураспада агента, связывающего РНК гид с ДНК. В некоторых вариантах воплощения изобретения гетерологичный функциональный домен может быть способен

повышать стабильность агента, связывающего РНК гид с ДНК. В некоторых вариантах воплощения изобретения гетерологичный функциональный домен может быть способен снижать стабильность агента, связывающего РНК гид с ДНК. В некоторых вариантах воплощения изобретения гетерологичный функциональный домен может действовать как сигнальный пептид деградации белков. В некоторых вариантах воплощения изобретения деградация белков может быть опосредована протеолитическими ферментами, такими как, например, протеасомы, лизосомальные протеазы, или калпайн протеазы. В некоторых вариантах воплощения изобретения гетерологичный функциональный домен может включать PEST последовательность. В некоторых вариантах воплощения изобретения агент, связывающий РНК гид с ДНК, может быть модифицирован дополнением убиквитина или цепи полиубиквитина. В некоторых вариантах воплощения изобретения убиквитин может быть убиквитин-подобным белком (UBL). Примеры убиквитин-подобных белков включают, но не ограничиваются, такими как малый убиквитин-подобный модификатор (SUMO), убиквитин перекрестно-реактивный белок (UCRP, также известный как стимулируемый интерфероном ген 15 (ISG15)), связанный с убиквитином модификатор 1 (URM1), экспрессируемый в предшественниках нервных клеток белок 8, транскрипция которого снижается в процессе развития (NEDD8, также названный Rub1 в *S. cerevisiae*), F-ассоциированный антиген лейкоцитов человека (FAT10), аутофаг 8 (ATG8) и-12 (ATG12), Fau убиквитин-подобный белок (FUB1), фиксируемый мембраной UBL (MUB), модификатор конъюгации убиквитина-1 (UFM1), и убиквитин-подобный белок 5 (UBL5).

[60] В некоторых вариантах воплощения изобретения гетерологичный функциональный домен может быть маркерным доменом. Примеры маркерных доменов включают, но не ограничиваются, такими как флуоресцентные белки, метки очистки, метки эпитопа и последовательности гена репортера. В некоторых вариантах воплощения изобретения маркерный домен может быть флуоресцентным белком. Примеры соответствующих флуоресцентных белков включают, но не ограничиваются, такими как зеленые флуоресцентные белки (*например*, GFP, GFP-2, tagGFP, turboGFP, sfGFP, EGFP, Emerald, Azami Green, Monomeric Azami Green, CopGFP, AceGFP, ZsGreen1), желтые флуоресцентные белки (*например*, YFP, EYFP, Citrine, Venus, YPet, PhiYFP, ZsYellow1), синие флуоресцентные белки (*например*, EBFP, EBFP2, Azurite, mKalamal, GFPuv, Sapphire, T-sapphire), голубые флуоресцентные белки (*например*, ECFP, Cerulean, CyPet, AmCyan1, Midoriishi-Cyan), красные флуоресцентные белки (*например*, mKate, mKate2, mPlum, DsRed monomer, mCherry, mRFP1, DsRed-Express, DsRed2, DsRed-Monomer, HcRed-Tandem, HcRed1, AsRed2, eqFP611, mRaspberry, mStrawberry, Jred) и оранжевые флуоресцентные белки (mOrange, mKO, Kusabira- Orange, Monomeric Kusabira-Orange, mTangerine, tdTomato) или любой другой соответствующий флуоресцентный белок. В других вариантах воплощения изобретения маркерный домен может быть меткой очистки и/или меткой эпитопа. Иллюстративные примеры меток включают, но не ограничиваются ими, глутатион-S-трансферазу (GST), белок, связывающий хитин (CBP), белок, связывающий мальтозу (MBP), тиредоксин (TRX), поли-(NANP), тандемную аффинную очистку (TAP)

tag, myc, AcV5, AU1, AU5, E, ECS, E2, FLAG, HA, nus, Softag 1, Softag 3, Strep, SBP, Glu-Glu, HSV, KT3, S, S1, T7, V5, VSV-G, 6xHis, 8xHis, белок носитель карбоксила биотина (BCCP), poly-His и кальмомодулин. Иллюстративные примеры генов репортера включают, но не ограничиваются ими, глутатион-S-трансферазу (GST), пероксидазу хрона (HRP), хлорамфеникол ацетилтрансферазу (CAT), бета-галактозидазу, бета-глюкононидазу, люциферазу или флуоресцентные белки.

[61] В дополнительных вариантах воплощения изобретения гетерологичный функциональный домен может нацеливать агент, связывающий РНК гид с ДНК, на определенную органеллу, клетку, ткань, или орган. В некоторых вариантах воплощения изобретения гетерологичный функциональный домен может нацеливать агент, связывающий РНК гид с ДНК, на митохондрию.

[62] В дальнейших вариантах воплощения изобретения гетерологичный функциональный домен может быть эффекторным доменом. Когда агент, связывающий РНК гид с ДНК, ориентирован к его таргетной последовательности, *например*, когда нуклеаза Cas направлена к таргетной последовательности gRNA, эффекторный домен может модифицировать или влиять на таргетную последовательность. В некоторых вариантах воплощения изобретения эффекторный домен может быть выбран из домена, связывающего нуклеиновую кислоту, домена нуклеазы (например, не Cas нуклеазный домен), домена эпигенетической модификации, домена активации транскрипции или домена гена - репрессора транскрипции. В некоторых вариантах воплощения изобретения гетерологичный функциональный домен является нуклеазой, такой как нуклеаза FokI. Смотрите, например, патент США № 9023649. В некоторых вариантах воплощения изобретения гетерологичный функциональный домен является активатором транскрипции или геном-репрессором. Смотрите, например, Qi с соавторами: «Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression», *Cell* 152:1173-83 (2013); Perez-Pinera с соавторами, «RNA-guided gene activation by CRISPR-Cas9-based transcription factors», *Nat. Methods* 10:973-6 (2013); Mali с соавторами, «CAS9 transcriptional activators for target specificity screening and paired nickases for cooperative genome engineering», *Nat. Biotechnol.* 31:833-8 (2013); Gilbert с соавторами, «CRISPR-mediated modular RNA-guided regulation of transcription in eukaryotes», *Cell* 154:442-51 (2013). Также, агент, связывающий РНК гид с ДНК, по существу становится фактором транскрипции, который может быть ориентирован на то чтобы связывать желательную таргетную последовательность, используя РНК гид.

Оценка эффективности gRNA

[63] В некоторых вариантах воплощения изобретения эффективность gRNA определяется при ее внесении или когда она экспрессируется вместе с другими компонентами, которые формируют RNP. В некоторых вариантах воплощения изобретения gRNA экспрессируется вместе с РНК гидом нуклеазы ДНК, такой как белок Cas. В некоторых вариантах воплощения изобретения gRNA вносится или экспрессируется в линии клеток, которые уже стабильно экспрессируют РНК гид нуклеазы ДНК, такой как

белок Cas. В некоторых вариантах воплощения изобретения gRNA вносится в клетку как часть RNP. В некоторых вариантах воплощения изобретения gRNA вводится в клетку вместе с мРНК, кодирующей РНК гид нуклеазы ДНК, такой как нуклеаза Cas.

[64] Как представлено в этом документе, использование РНК гида нуклеазы ДНК и РНК гида, раскрытого в этом документе, может привести к двухнитевым разрывам в ДНК, которые могут вызвать ошибку с формированием мутаций инсерций/делеций (indel) после их репарации клеточными системами. Многие мутации вследствие инсерций/делеций изменяют рамку считывания или вводят преждевременные стоп кодоны, что приводит к образованию нефункционального белка.

[65] В некоторых вариантах воплощения изобретения, эффективность специфических gRNA определена *in vitro* в модельных системах. В некоторых вариантах воплощения изобретения моделью *in vitro* являются клетки НЕК293, которые стабильно экспрессируют Cas9 (НЕК293_Cas9). В некоторых вариантах воплощения изобретения моделью *in vitro* являются клетки гепатокарциномы человека HUH7. В некоторых вариантах воплощения изобретения моделью *in vitro* являются клетки HepG2. В некоторых вариантах воплощения изобретения моделью *in vitro* являются первичные гепатоциты человека. В некоторых вариантах воплощения изобретения моделью *in vitro* являются первичные гепатоциты яванской макаки. Относительно использования первичных гепатоцитов человека, то здесь могут применяться коммерчески доступные первичные гепатоциты человека для обеспечения согласованности доказательств между экспериментами.

[66] В некоторых вариантах воплощения изобретения количество нетаргетных участков с делециями или инсерциями в модели *in vitro* (например, в первичных гепатоцитах человека) определяется, например, при анализе геномной ДНК из первичных гепатоцитов человека, трансфицированных *in vitro* мРНК Cas9 и РНК гидом. В некоторых вариантах воплощения изобретения, такое определение включает анализ геномной ДНК из первичных гепатоцитов человека, трансфицированных *in vitro* мРНК Cas9, РНК гидом и донорским олигонуклеотидом. Иллюстративные методы таких определений в действующих образцах представлены далее.

[67] В некоторых вариантах воплощения изобретения оценка эффективности специфических gRNA выполнена в процессе многократного отбора клеток с gRNA в модели *in vitro*. В некоторых вариантах воплощения изобретения выполнено сравнение линий клеток с выбранными gRNA. В некоторых вариантах воплощения изобретения выполнен перекрестный скрининг многих клеточных моделей.

[68] В некоторых вариантах воплощения изобретения, эффективность специфических gRNA определена на основании оценки в моделях *in vivo*. В некоторых вариантах воплощения изобретения моделью *in vivo* является модель на грызунах. В некоторых вариантах воплощения изобретения моделью на грызунах служат мыши, которые экспрессируют ген *TTR человека*, который может быть мутантом гена *TTR человека*. В некоторых вариантах воплощения изобретения моделью *in vivo* являются

приматы, например обезьяна яванская макака. В некоторых вариантах воплощения изобретения эффективность РНК гида измерена как процент редактируемого *TTR*. В некоторых вариантах воплощения изобретения процент редактирования *TTR* сравнивали с процентом, редактирования белка *TTR*, требуемого для обеспечения нокдауна белка *TTR*, например, в средах культивирования клеток в условиях модели *in vitro* или в сыворотке и ткани в случае модели *in vivo*.

[69] В некоторых вариантах воплощения изобретения эффективность РНК гида оценивается по количеству и/или частоте инсерций/делеций (*indels*) в нетаргетных последовательностях генома клетки, таргетного типа. В некоторых вариантах воплощения изобретения представлены эффективные РНК гиды, которые демонстрируют очень низкую частоту инсерций/делеций в нетаргетных сайтах (например, менее 5%) в популяции клеток и/или относительно их частоты образования на таргетном участке. Таким образом, представленное раскрытие предусматривает РНК гид, который не демонстрирует формирования инсерций/делеций в клетках таргетного типа (например, в гепатоцитах), или который вызывает формирование нетаргетных инсерций/делеций менее 5% в популяции клеток и/или относительно их частоты на таргетном участке. В некоторых вариантах воплощения изобретения раскрытие обеспечивает РНК гид, который не демонстрирует формирование нетаргетных делеций/инсерций в клетках таргетного типа (например, в гепатоцитах). В некоторых вариантах воплощения изобретения представлен РНК гид, который формирует менее 5% инсерций/делеций на нетаргетных сайтах, например, как оценено одним или более способами, представленными в данном документе.

[70] В некоторых вариантах воплощения изобретения представлен РНК гид, который формирует инсерции/делеции в количестве менее чем или равном 4, 3, 2, или 1 в нетаргетном сайте, например, как оценено одним или более способами, представленными в данном документе. В некоторых вариантах воплощения изобретения нетаргетный сайт (ы) не выявляется в белке, который кодируется доменом гена в таргетной клетке (например, в гепатоците).

[71] В некоторых вариантах воплощения изобретения, детектированы события, редактирующие ген, такие как формирование мутаций при делеции/инсерции («*indel*») и направленная гомологичная репарация (*HDR*), события в таргетной ДНК с использованием линейной амплификации с меченым праймером и выделения меченых продуктов амплификации (в представленном документе далее названо как «*LAM-PCR*» или способ «линейной амплификации (*LA*)»).

[72] В некоторых вариантах воплощения изобретения способ включает выделение клеточной ДНК из клетки, в которой индуцирован двойной разрыв нити (*DSB*) и, необязательное, по предоставленной матрице *HDR*, репарирование *DSB*. Выполняется по меньшей мере один цикл линейной амплификации ДНК с меченым праймером, с дальнейшим выделением продуктов линейной репарации с включенной меткой. Таким образом, исключается любой продукт амплификации, который был амплифицирован с немеченым праймером; кроме того, необязательно, выполняется амплификация

изолированного продукта и анализ продуктов линейной амплификации, или продуктов дальнейшей амплификации, чтобы определить наличие или отсутствие события редактирования такого как, например, двойной разрыв нити, инсерция, делеция, или матрица последовательности HDR в таргетной ДНК. В некоторых случаях, событие редактирования может быть определено количественно. Определение количества и подобные термины, используемые в представленном документе (включая в контексте HDR и не-HDR редактирование событий, таких как инсерции/делеции) включает обнаружение частоты и/или типа (ов) редактирования событий в образцах.

[73] В некоторых вариантах воплощения изобретения проводится только один цикл линейной амплификации.

[74] В некоторых случаях, меченый праймер включает молекулярный штрих-код. В некоторых вариантах воплощения изобретения меченый праймер включает молекулярный штрих-код и проводится только один цикл линейной амплификации.

[75] В некоторых вариантах воплощения изобретения шаг анализа включает секвенирование продуктов линейной амплификации или продуктов дальнейшей амплификации. Секвенирование может включать любой современный способ геномной инженерии, включая секвенирование следующей генерации и клонирование продуктов линейной амплификации или продуктов последующей амплификации в плазмиде и секвенирование плазмиды или фрагмента плазмиды. В других аспектах шаг анализа включает проведение цифровой полимеразной цепной реакции (dPCR) или цифровой капельной ПЦР (ddPCR) продуктов линейной амплификации или продуктов дальнейшей амплификации. В других случаях шаг анализа включает взаимодействие продуктов линейной амплификации или последующих амплифицированных продуктов с зондом на основе нуклеиновой кислоты, разработанным для идентификации ДНК, включающим матрицу последовательности HDR и детектируемые зонды, которые связались с продуктом (ами) линейной амплификации или последующей амплификации. В некоторых вариантах воплощения изобретения способ дополнительно включает определение позиции матрицы HDR в таргетной ДНК.

[76] В отдельных вариантах воплощения изобретения способ дополнительно включает определение инсерции сайта в последовательности таргетной ДНК, отличающейся тем, что инсерция сайта является позицией, в которой матрица HDR включена в таргетную ДНК, и отличающейся тем, что инсерции в сайте могут включать некоторую таргетную последовательность ДНК и некоторую последовательность матрицы HDR.

[77] В некоторых вариантах воплощения изобретения линейная амплификация таргетной ДНК с маркерным линкером выполнена для 1-50 циклов, 1-60 циклов, 1-70 циклов, 1-80 циклов, 1-90 циклов или 1-100 циклов.

[78] В некоторых вариантах воплощения изобретения линейная амплификация таргетной ДНК с маркерным линкером включает шаг денатурации для отделения дуплексов ДНК, шаг денатурации, позволяющий связывание праймера и шаг элонгации. В некоторых

вариантах воплощения изобретения линейная амплификация является изотермической (не требует изменения температуры). В некоторых вариантах воплощения изобретения изотермическая линейная амплификация является петлевой изотермической амплификацией (LAMP), амплификацией с замещением цепей (SDA), амплификацией, зависимой от геликазы, или амплификацией с участием ферментативной реакции.

[79] В некоторых вариантах воплощения изобретения маркерный линкер ренатурирует в таргетной ДНК по меньшей мере, 50; по меньшей мере 60; по меньшей мере 70; по меньшей мере 80; по меньшей мере 90; по меньшей мере 100; по меньшей мере 110; по меньшей мере 120; по меньшей мере 130; по меньшей мере 140; по меньшей мере 150; по меньшей мере 160; по меньшей мере 170; по меньшей мере 180; по меньшей мере 190; по меньшей мере 200; по меньшей мере 210; по меньшей мере 220; по меньшей мере 230; по меньшей мере 240; по меньшей мере 250; по меньшей мере 260; по меньшей мере 270; по меньшей мере 280; по меньшей мере 290; по меньшей мере 300; по меньшей мере 1 000; по меньшей мере 5 000 или по меньшей мере 10 000 нуклеотидов, отдаленных от ожидаемой позиции редактирования события, например, инсерций, делеций, или инсерций сайта матрицы. В некоторых вариантах воплощения изобретения маркерный линкер включает молекулярный штрих-код. В некоторых вариантах воплощения изобретения молекулярный штрих-код включает последовательность, которая не комплементарна к таргетной ДНК. В некоторых вариантах воплощения изобретения молекулярный штрих-код включает 6, 8, 10 или 12 нуклеотидов.

[80] В некоторых вариантах воплощения изобретения меткой для праймера является биотин, стрептавидин, дигоксигенин, последовательность ДНК или флуоресцеин изотиоцианат (FITC).

[81] В некоторых вариантах воплощения изобретения продукт(ы) линейной амплификации выделяется с помощью иммобилизованного реагента, специфического для метки праймера. В некоторых вариантах воплощения изобретения реагент захвата иммобилизован на сферах, твердой подложке, матрице или на колонке. В некоторых вариантах воплощения изобретения этап выделения включает взаимодействие продукта (ов) линейной амплификации с иммобилизованным реагентом, специфическим для метки праймера. В некоторых вариантах воплощения изобретения меткой для праймера является биотин, стрептавидин, дигоксигенин, последовательность ДНК или флуоресцеин изотиоцианат (FITC).

[82] В некоторых вариантах воплощения изобретения меткой для праймера является биотин, а иммобилизованным реагентом является стрептавидин. В некоторых вариантах воплощения изобретения меткой является стрептавидин, а иммобилизованным реагентом является биотин. В некоторых вариантах воплощения изобретения метка находится на 5' конце праймера, 3' конце праймера, или внутри праймера. В некоторых вариантах воплощения, метка и/или иммобилизованный реагент удаляются после этапа выделения. В некоторых вариантах воплощения, метка и/или иммобилизованный реагент не удаляются и выполняются дальнейшие шаги амплификации и анализа в присутствии

метки и/или иммобилизованного реагента.

[83] В некоторых вариантах воплощения последующая амплификация является нелинейной. Некоторые варианты воплощения изобретения отличаются тем, что, последующая амплификация является цифровой PCR, qPCR, или ПЦР в реальном времени (RT-PCR). В некоторых вариантах воплощения изобретения секвенирование является секвенированием следующего поколения (NGS).

[84] В некоторых вариантах воплощения изобретения таргетная ДНК является геномной или митохондриальной. В некоторых вариантах воплощения изобретения таргетная ДНК является геномной ДНК прокариотических или эукариотических клеток. В некоторых вариантах воплощения изобретения таргетная ДНК является ДНК млекопитающих. Таргетная ДНК может быть из неделящихся или делящихся клеток. В некоторых вариантах воплощения изобретения таргетная ДНК может быть из стволовых клеток. В некоторых вариантах воплощения изобретения таргетная ДНК может быть из реплицированных клеток.

[85] В некоторых случаях, клеточную ДНК фрагментируют перед линейной амплификацией. В некоторых вариантах воплощения изобретения у фрагментированной ДНК средний размер составляет от 0,5 тысяч пар нуклеотидов (т.п.н.) до 20 т.п.н. В некоторых случаях, клеточную ДНК фрагментируют до среднего размера: 0,5; 0,75; 1,0; 1,25; 1,5; 1,75; 2,0; 2,25; 2,5; 2,75; 3,0; 3,25; 3,5; 3,75; 4,0; 4,25; 4,5; 4,75; 5,0; 5,25; 5,5; 5,75; 6,0; 6,25; 6,5; 6,75; 7,0; 7,25; 7,5; 7,75; 8,0; 8,25; 8,5; 8,75; 9,0; 9,25; 9,5; 9,75; 10,0; 10,25; 10,5; 10,75; 11,0; 11,25; 11,5; 11,75; 12,0; 12,25; 12,5; 12,75; 13,0; 13,25; 13,5; 13,75; 14,0; 14,25; 14,5; 14,75; 15,0; 15,25; 15,5; 15,75; 16,0; 16,25; 16,5; 16,75; 17,0; 17,25; 17,5; 17,75; 18,0; 18,25; 18,5; 18,75; 19,0; 19,25; 19,5; 19,75 или 20,0 т.п.н. В некоторых случаях, клеточную ДНК фрагментируют до среднего размера, приблизительно, 1,5 т.п.н.

[86] В некоторых вариантах воплощения изобретения эффективность РНК гида оценена по секреции TTR. В некоторых вариантах воплощения изобретения секреция TTR измерена с использованием метода твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA) в пробах сред культивирования клеток или в сыворотке. В некоторых вариантах воплощения изобретения секреция TTR измерена в тех же системах *in vitro*, или *in vivo* или в моделях, используемых для определения редактирования. В некоторых вариантах воплощения изобретения, секреция TTR измерялась в первичных гепатоцитах человека. В некоторых вариантах воплощения изобретения секреция TTR измерялась в клетках HUH7. В некоторых вариантах воплощения изобретения секреция TTR измерялась в клетках HepG2.

[87] Метод количественного анализа ELISA является общеизвестным в молекулярной биологии и может быть модифицирован для определения уровней TTR в сыворотке. В одном иллюстративном варианте воплощения забиралась кровь и выделялась сыворотка. Общие уровни TTR в сыворотке могут быть определены с использованием преальбумина мыши (транстиретин) набора ELISA (Aviva Systems Biology, каталожный номер: OKIA00111) или подобного набора для измерения человеческого TTR. Если не доступен никакой из наборов, может быть разработан метод ELISA, с использованием

планшет, предварительно покрытых иммобилизованными антителами, специфичными для каждого определяемого TTR. Планшеты далее инкубируются при комнатной температуре в течение определенного периода времени перед промывкой. Вносится конъюгат фермент-антитело против TTR и планшет инкубируется. Несвязанные с конъюгатом антитела удаляются, а планшет промывается перед внесением раствора хромогенного субстрата, который реагирует с ферментом. Планшет считывается на соответствующем ридере для считывания планшет при длине волны, характерной для данного фермента и используемого субстрата.

[88] В некоторых вариантах воплощения изобретения количество TTR в клетках (включая, те, которые из ткани) оценивают по эффективности gRNA. В некоторых вариантах воплощения изобретения количество TTR в клетках оценивают методом вестерн-блоттинга. В некоторых вариантах воплощения изобретения, используемые клетки являются клетками HUH7. В некоторых вариантах воплощения изобретения используемая клетка является первичным гепатоцитом человека. В некоторых вариантах воплощения изобретения используемая клетка является стволовой клеткой, полученной у животного. В некоторых вариантах воплощения изобретения количество TTR сравнивается с количеством глицеральдегид 3-фосфат дегидрогеназы (GAPDH) (вспомогательный ген) для контроля изменений количества клеток.

Составы LNP и лечение ATTR

[89] В некоторых вариантах воплощения изобретения представлен способ индукции двуспирального разрыва (DSB) в гене *TTR*, включая применение композиции, содержащей РНК гид, включающий любую одну или более из последовательностей гида из SEQ ID №: 5-82, или любую одну или более sgRNA SEQ из ID№: 87-124. В некоторых вариантах воплощения изобретения, gRNA, которые включают любую одну или более из последовательностей гида SEQ ID №: 5-82, применяются для того, чтобы вызвать DSB в гене *TTR*. РНК гида могут применяться вместе с РНК гидом нуклеазы ДНК, такой как нуклеаза Cas (например, Cas9) или мРНК или вектором, кодирующим РНК гид нуклеазы ДНК, таким как нуклеаза Cas (например, Cas9).

[90] В некоторых вариантах воплощения изобретения представлен способ модификации гена *TTR*, включая применение композиции, содержащей РНК гид, включающей любую одну или более из последовательностей гида из SEQ ID №: 5-82, или любую одну или более из sgRNA SEQ ID№: 87-124. В некоторых вариантах воплощения изобретения, gRNA включают любую одну или более последовательностей гида из SEQ ID №: 5-82, или любую одну или более из sgRNA SEQ ID№: 87-124, которые применяются для модификации гена *TTR*. РНК гида могут применяться вместе с РНК гидом нуклеазы ДНК, такой как нуклеаза Cas (например, Cas9) или мРНК или вектором, кодирующим РНК гид нуклеазы ДНК, таким как нуклеаза Cas (например, Cas9).

[91] В некоторых вариантах воплощения изобретения представлен способ лечения ATTR, включающий введение композиции, содержащей РНК гид, включающей любую одну или более последовательностей гида из SEQ ID №: 5-82, или любую одну или более

из sgRNA SEQ ID№: 87-124. В некоторых вариантах воплощения изобретения, gRNA включают любую одну или более из последовательностей гида SEQ ID №: 5-82, или любую одну или более из sgRNA SEQ ID№: 87-124, которые применяются для лечения АТТР. РНК гида могут применяться вместе с РНК гидом нуклеазы ДНК, такой как нуклеаза Cas (например, Cas9) или мРНК или с вектором, кодирующим РНК гид нуклеазы ДНК, таким как нуклеаза Cas (например, Cas9).

[92] В некоторых вариантах воплощения изобретения представлен способ снижения концентрации ТТР в сыворотке, включающий введение композиции, содержащей РНК гид, включающей любую одну или более из последовательностей гида из SEQ ID №: 5-82, или любую одну или более из sgRNA SEQ ID№: 87-124. В некоторых вариантах воплощения изобретения, gRNA включают любую одну или более из последовательностей гида SEQ ID №: 5-82, или любую одну или более из sgRNA SEQ ID№:87-124, которые применяются для снижения или предотвращения накопления ТТР в амилоидах или в амилоидных фибриллах. gRNA может применяться вместе с РНК гидом нуклеазы ДНК, такой как нуклеаза Cas (например, Cas9) или с мРНК или с вектором, кодирующим РНК гид нуклеазы ДНК, таким как нуклеаза Cas (например, Cas9).

[93] В некоторых вариантах воплощения изобретения представлен способ снижения или предотвращения накопления ТТР в амилоидах или амилоидных фибриллах субъекта, включающий введение композиции, содержащей РНК гид, включающей любую одну или более из последовательностей гида из SEQ ID №: 5-82, или любую одну или более из sgRNA SEQ ID№: 87-124. В некоторых вариантах воплощения изобретения представлен способ снижения или предотвращения накопления ТТР в амилоидах или амилоидных фибриллах субъекта, включающий введение композиции, содержащей любую одну или более из sgRNA SEQ ID №: 87-113. В некоторых вариантах воплощения изобретения, gRNA включают любую одну или более из последовательностей гида SEQ ID №: 5-82, или любую одну или более из sgRNA SEQ ID №: 87-124, которые применяются для снижения или предотвращения накопления ТТР в амилоидах или амилоидных фибриллах. gRNA может применяться вместе с РНК гидом нуклеазы ДНК, такой как нуклеаза Cas (например, Cas9), или на мРНК, или с вектором, кодирующим РНК гид нуклеазы ДНК, таким как нуклеаза Cas (например, Cas9).

[94] В некоторых вариантах воплощения изобретения gRNA включает последовательности гида Таблицы 1 или одну или более sgRNA из Таблицы 2 вместе с РНК гидом нуклеазы ДНК, такой как нуклеаза Cas, которая индуцируя DSB, и негомологичное соединение концов (NHEJ) во время репарации, приводит к мутации в гене *TTR*. В некоторых вариантах воплощения изобретения NHEJ приводит к делеции или инсерции нуклеотида (ов), которые индуцируют сдвиг рамки считывания или нонсенс мутацию в гене *TTR*.

[95] В некоторых вариантах воплощения, применение РНК гида данного изобретения (например, представленной в настоящем документе композиции) снижает уровни ТТР у субъекта (например, уровни в сыворотке), и поэтому предотвращает

накопление и агрегацию TTR в амилоидах или амилоидных фибриллах.

[96] В некоторых вариантах воплощения, снижение или предотвращение накопления TTR в амилоидах или амилоидных фибриллах у субъекта включает снижение или предотвращение депонирования TTR в одной или более тканях субъекта, таких как желудок, толстая кишка или нервная ткань. В некоторых вариантах воплощения изобретения нервная ткань включает седалищный нерв или нейроны задних корешков спинного мозга. В некоторых вариантах воплощения изобретения депонирование TTR снижено в два, три, или четыре раза в желудке, толстой кишке, ганглиях задних корешков спинного мозга и седалищного нерва. Уровень депонирования в данной ткани может определяться в биопсийных образцах, например, используя метод иммунного окрашивания. В некоторых вариантах воплощения, снижение или предотвращение накопления TTR в амилоидах или амилоидных фибриллах субъекта и/или снижение или предотвращение депонирования TTR логически базируется на снижении уровней TTR в сыворотке за определенный период времени. Согласно результатам обсуждения примеров выявлено, что снижение уровней TTR в сыворотке, определяемое используемыми способами, обеспечило доказательства о клиренсе депонированного TTR из обсуждаемых выше тканей и примеров, например, при измерении через 8 недель после введения композиции.

[97] В некоторых вариантах воплощения изобретения субъект является млекопитающим. В некоторых вариантах воплощения изобретения субъект является человеком. В некоторых вариантах воплощения изобретения субъектами являются коровы, свиньи, обезьяны, овцы, собаки, кошки, рыбы или домашняя птица.

[98] В некоторых вариантах воплощения изобретения использование РНК гида, включающих любую одну или более из последовательностей гида Таблицы 1 или одну или более sgRNA от Таблицы 2 (например, в композиции этого документа), представлено для подготовки лекарственного препарата для лечения АТТТ у человека.

[99] В некоторых вариантах воплощения изобретения РНК гид, композиции и составы применяются внутривенно. В некоторых вариантах воплощения изобретения РНК гид, композиции и составы вводятся в печеночный кровоток.

[100] В некоторых вариантах воплощения изобретения разовое введение композиции, включающей РНК гида, представленную в этом документе, достаточно, чтобы снизить экспрессию белка мутанта. В некоторых вариантах воплощения изобретения, представленное в этом документе, разовое введение композиции, включающей РНК гида, достаточно для нокдауна экспрессии белка мутанта в популяции клеток. В других вариантах воплощения в представленном документе обеспечено доказательства, что более одного введения композиции, включающей РНК гид, может быть успешным для максимизации редактирования благодаря кумулятивным эффектам. Например, представленная в этом документе композиция может вводиться 2, 3, 4, 5 или больше раз, например, 2 раза. Введение может быть через определенный период времени, например, от 1 дня до 2 лет, в частности от 1 до 7 дней, от 7 до 14 дней, от 14 до 30 дней, от 30 до 60 дней, от 60 до 120 дней, от 120 до 183 дней, от 183 до 274 дней, от 274 до 366 дней или от 366

дней до 2 лет.

[101] В некоторых вариантах воплощения изобретения композиция применяется в эффективном количестве в диапазоне от 0,01 до 10 мг/кг; например, от 0,01 до 0,1 мг/кг; от 0,1 до 0,3 мг/кг; от 0,3 до 0,5 мг/кг; от 0,5 до 1 мг/кг; от 1 до 2 мг/кг; от 2 до 3 мг/кг; от 3 до 5 мг/кг; от 5 до 10 мг/кг; или 0,1; 0,2; 0,3; 0,5; 1, 2, 3, 5 или 10 мг/кг.

[102] В некоторых вариантах воплощения изобретения эффективность лечения композициями заявляемого изобретения отмечена в период 1 года, 2 лет, 3 лет, 4 лет, 5 лет или спустя 10 лет после введения. В некоторых вариантах воплощения изобретения эффективность лечения композициями изобретения оценена при измерении уровней TTR в сыворотке до и после лечения. В некоторых вариантах воплощения изобретения эффективность лечения композициями, оцененная по снижению уровней TTR в сыворотке, отмечена в 1 неделю, 2 недели, 3 недели, 4 недели, 2 месяца, 3 месяца, 4 месяца, 5 месяцев, 6 месяцев, 7 месяцев, 8 месяцев, 9 месяцев, 10 месяцев или в 11 месяцев.

[103] В некоторых вариантах воплощения изобретения лечение замедляет или останавливает прогрессию заболевания.

[104] В некоторых вариантах воплощения изобретения лечение замедляет или останавливает прогрессию FAP. В некоторых вариантах воплощения изобретения лечение заканчивается выздоровлением, стабилизацией, или замедлением прогрессирования симптомов сенсорно-моторной нейропатии или автономной нейропатии.

[105] В некоторых вариантах воплощения изобретения лечение заканчивается выздоровлением, стабилизацией, или замедлением изменения в симптомах FACS. В некоторых вариантах воплощения изобретения лечение заканчивается выздоровлением, стабилизацией, или замедлением прогрессирования симптомов рестриктивной кардиомиопатии или застойной сердечной недостаточности.

[106] В некоторых вариантах воплощения изобретения эффективность лечения измерена по увеличению продолжительности жизни субъекта. В некоторых вариантах воплощения изобретения эффективность лечения измерена по ускорению или замедлению прогрессирования симптомов сенсорно-моторной или автономной нейропатии. В некоторых вариантах воплощения изобретения эффективность лечения оценена по увеличению или снижению двигательной способности какой-либо части тела или по ощущениям в любой части тела.

[107] В некоторых вариантах воплощения изобретения эффективность лечения оценена по улучшению или ухудшению либо замедлению способности глотания; дыхания; движения руки, кисти, движений ноги; ступни, или общей двигательной способности. В некоторых вариантах воплощения изобретения эффективность лечения оценена по улучшению или замедлению прогрессии невралгии. В некоторых вариантах воплощения изобретения невралгия характеризовалась болью, жжением, покалыванием или атипичным ощущением. В некоторых вариантах воплощения изобретения эффективность лечения оценена по ускорению или по замедлению прогрессии постуральной гипотензии, головокружения, нарушения желудочно-кишечного моторики, дисфункции мочевого

пузыря, или половой дисфункции. В некоторых вариантах воплощения изобретения эффективность лечения оценена по ускорению или замедлению прогрессирования слабости. В некоторых вариантах воплощения изобретения эффективность лечения оценена используя электромиограмму, тесты на проводимость нерва или на основании результатов, сообщаемых пациентом.

[108] В некоторых вариантах воплощения изобретения эффективность лечения оценена по ускорению или замедлению прогрессии симптомов застойной сердечной недостаточности или CHF. В некоторых вариантах воплощения изобретения эффективность лечения оценена по уменьшению или по замедлению прогрессии одышки, дисфункции дыхания, усталости, или отека в лодыжках, ногах, брюшной полости, или в шейных венах. В некоторых вариантах воплощения изобретения эффективность лечения оценена по ускорению или замедлению прогрессии накопления жидкости в теле, которое может быть оценено по увеличению массы, частоте мочеиспускания или ночному кашлю. В некоторых вариантах воплощения изобретения эффективность лечения оценена с использованием кардиальных биомаркеров (такие как натрийуретический пептид В-типа [BNP] или N-терминальный натрийуретический про-пептид b-типа [NT-proBNP]), тестов функции легкого, рентгенографии грудной клетки или электрокардиографии.

А. Комбинированная терапия

[109] В некоторых вариантах воплощения изобретения, представленное изобретение включает комбинированную терапию, включающую любую из gRNA, которая содержит любую одну или более из последовательностей гена, раскрытых в Таблице 1 или любую одну или более из sgRNA из Таблицы 2 (например, в композициях, представленных в этом документе) вместе с соответствующей дополнительной терапией для купирования симптомов ATTR.

[110] В некоторых вариантах воплощения изобретения дополнительная терапия для ATTR является лечением сенсорно-моторной или автономной нейропатии. В некоторых вариантах воплощения изобретения лечение сенсорно-моторной или автономной нейропатии включает нестероидные противовоспалительные препараты, антидепрессанты, противосудорожные препараты, антиаритмические препараты или наркотические агенты. В некоторых вариантах воплощения изобретения антидепрессантом является трициклический агент или ингибитор повторного всасывания серотонина-норэпинефрина. В некоторых вариантах воплощения изобретения антидепрессантами являются amitriptилин, дулоксетин или венлафаксин. В некоторых вариантах воплощения изобретения противосудорожными препаратами являются габапентин, прегабалин, топирамат или карбамазепин. В некоторых вариантах воплощения изобретения дополнительной терапией сенсорно-моторной нейропатии является чрескожная электрическая стимуляция нерва.

[111] В некоторых вариантах воплощения изобретения дополнительной терапией для ATTR является лечение рестриктивной кардиомиопатии или застойной сердечной недостаточности (CHF). В некоторых вариантах воплощения изобретения для лечения CHF

применяются: ингибитор фермента превращающего ангиозин (АСЕ), антагонист альдостерона, блокатор рецептора ангиотензина, бета-блокатор, дигоксин, диуретик или изосорбид динитрат/гидралазин гидрохлорид. В некоторых вариантах воплощения изобретения ингибиторами АСЕ являются эналаприл, каптоприл, рамиприл, периндоприл, имидаприд или квинаприл. В некоторых вариантах воплощения изобретения антагонистом альдостерона являются эплерон или спиронолактон. В некоторых вариантах воплощения изобретения блокатором рецептора ангиотензина являются азилсартан, кадесартан, эпросартан, ирбесартан, лозасартан, олмесартан, телмисартан или вальсартан. В некоторых вариантах воплощения изобретения бета-блокатором являются ацебутонол, атенолол, бисопролол, метопролол, надолол, небиволол или пропранолол. В некоторых вариантах воплощения изобретения диуретиками являются хлоротиазид, хлорталидон, гидрохлоротиазид, индапамид, метолазон, буметанид, фуросемид, торсемид, амилорид или триамтерен.

[112] В некоторых вариантах воплощения изобретения комбинированная терапия включает любую из gRNA, содержащую любую одну или более из последовательностей гида, раскрытых в Таблице 1 или любую одну или более sgRNA из Таблицы 2 (например, в предоставленной здесь композиции) вместе с siRNA, которая является таргетной к TTR или мутированному TTR. В некоторых вариантах воплощения изобретения siRNA является любой из siRNA способной к дальнейшему снижению элиминации экспрессии дикого типа или мутантного TTR. В некоторых вариантах воплощения изобретения siRNA является препаратом Патизиран (ALN-TTR02) или ALN-TTRsc02. В некоторых вариантах воплощения изобретения siRNA вводится после любой из gRNA, включающей любую одну или более из последовательностей гида, раскрытых в Таблице 1 или любую одну или более sgRNA из Таблицы 2 (например, в композиции, представленной в этом документе). В некоторых вариантах воплощения изобретения siRNA применяется на регулярной основе после лечения любой из композиций gRNA, представленных в этом документе.

[113] В некоторых вариантах воплощения изобретения комбинированная терапия включает любую из gRNA, содержащую любую одну или более из последовательностей гида, раскрытых в Таблице 1 или любую одну или более sgRNA из Таблицы 2 (например, в предоставленной здесь композиции) вместе с антисенсорным нуклеотидом, который является таргетным к TTR или к мутированному TTR. В некоторых вариантах воплощения изобретения антисенсорным нуклеотидом является любой антисенсорный нуклеотид, способный к дальнейшему снижению или элиминации экспрессии дикого типа или мутантного TTR. В некоторых вариантах воплощения изобретения антисенсорным нуклеотидом является препарат Инотерсен (IONS-TTRRX). В некоторых вариантах воплощения изобретения антисенсорный нуклеотид вводится после любой из gRNA, включающей любую одну или более из последовательностей гида, раскрытых в Таблице 1 или любую одну или более sgRNA из Таблицы 2 (например, в композиции, представленной в этом документе). В некоторых вариантах воплощения изобретения антисенсорный нуклеотид применяется на регулярной основе после лечения любой из композиций gRNA,

представленных в этом документе.

[114] В некоторых вариантах воплощения изобретения комбинированная терапия включает любую из gRNA, содержащую любую одну или более из последовательностей гида, раскрытых в Таблице 1 или любую одну или более sgRNA из Таблицы 2 (например, в предоставленной в этом документе композиции) вместе со стабилизатором малых молекул, который промотирует кинетическую стабилизацию правильно свернутой структуры тетрамерной формы TTR. В некоторых вариантах воплощения изобретения стабилизатором малых молекул является препарат Тафамидис (Виндагел®) или дифлунисал. В некоторых вариантах воплощения изобретения стабилизатор малых молекул вводится после любой из gRNA, включающей любую одну или более из последовательностей гида, раскрытых в Таблице 1 или любую одну или более sgRNA из Таблицы 2 (например, в композиции, представленной в этом документе). В некоторых вариантах воплощения изобретения стабилизатор малых молекул применяется на регулярной основе после лечения любой из композиций gRNA, представленных в этом документе.

В. Доставка композиций РНК гида (gRNA)

[115] В некоторых вариантах воплощения изобретения композиции РНК гида, представленные в этом документе, одни, или закодированные на одном или более векторах, сформированы или применяются с наночастицами липидов: смотрите, например, РСТ/US2017/024973, поданный 30 марта 2017 года под названием «СОСТАВЫ НАНОЧАСТИЦ ЛИПИДОВ ДЛЯ СИСТЕМ CRISPR/CAS» содержание которого полностью включено в данный документ посредством ссылки. Любые наночастицы липидов (LNP) широко применяемые в современных методах генной инженерии могут использоваться для доставки нуклеотидов субъектам. Они могут применяться для РНК гида, представленной в этом документе, а также для мРНК, кодирующей РНК гид нуклеазы ДНК, таких как Cas или Cas9, или для РНК гида нуклеазы ДНК, таких как Cas или, непосредственно, белка Cas9.

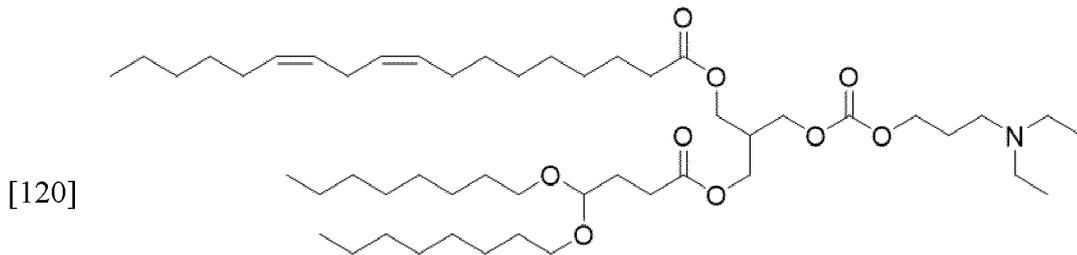
[116] Раскрытые в этом документе различные варианты воплощения составов LNP для РНК включают CRISPR /нагруженные Cas. Такие составы LNP могут включать (i) CCD липид, такой как аминоклипид, (ii) нейтральный липид, (iii) липид хелпера, и (iv) «липид - невидимку», например, липид PEG. Некоторые варианты воплощения составов LNP включают «аминоклипид» наряду с липидом хелпера, нейтральным липидом и липидом-невидимкой, таким как липид PEG. «Наночастица липида» является частицей, которая включает множество (то есть больше чем одну) молекул липида, которые физически связаны друг с другом межмолекулярными силами.

[117] Липиды CCD

[118] Композиции липида для доставки мРНК CRISPR/Cas и компонентов РНК гида в клетки печени включают липид CCD.

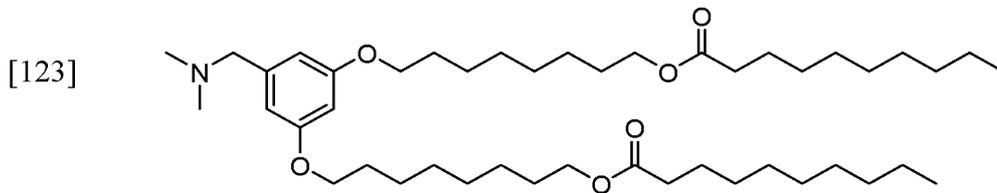
[119] В некоторых вариантах воплощения изобретения липид CCD является липидом А: (9Z, 12Z)-3-((4,4-бис (октилокси) бутаноил) окси)-2-(((3-(диэтиламино) пропокси) карбонил) окси) метил) пропил октадека-9, 12-диэноат, также называемый 3-

((4,4-бис (октилокси) бутаноил) окси)-2-(((3-(диэтиламино) пропокси) карбонил) окси) метил), пропил (9Z, 12Z)-октадека-9,12-диэноат. Липид А может быть представлен как:



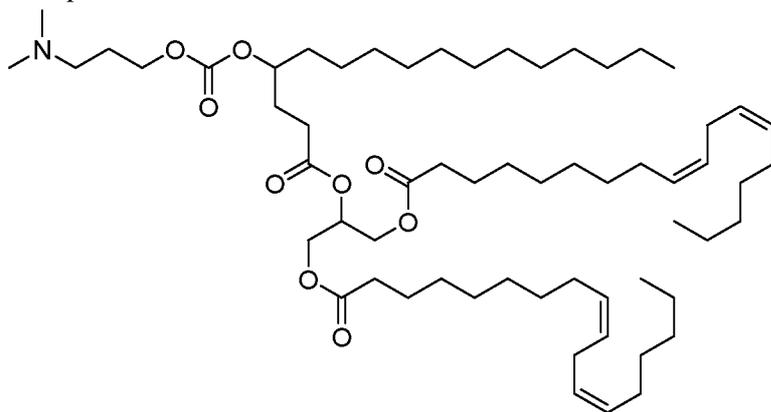
[121] Липид А может синтезироваться согласно W02015/095340 (например, стр. 84-86).

[122] В некоторых вариантах воплощения изобретения липид ССD является липидом В: ((5-((диметиламино) метил)-1, 3-фенилен) бис (окси)) бис (октан-8,1-диил) бис (деcanoат), также называемый ((5-((диметиламино) метил)-1, 3-фенилен) бис (окси)), бис (октан-8,1-диил) бис (деcanoат). Липид В может быть изображен как:



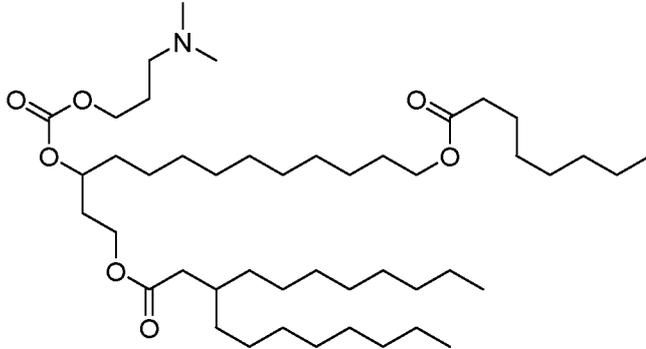
[124] Липид В может синтезироваться согласно WO2014/136086 (например, стр. 107-09).

[125] В некоторых вариантах воплощения изобретения липид ССD является липидом С: 2-(((4-(((3-(диметиламино) пропокси) карбонил) окси) гексадеconoил)окси), пропан-1,3-диил (9Z, 9'Z, 12Z, 12'Z)-бис (октадека-9,12-диэноат). Липид С может быть изображен как:



[126] В некоторых вариантах воплощения изобретения липид CCD является липидом D: 3-(((3-(диметиламино) пропокси) карбонил) окси)-13-(октаноилокси) тридецил 3-октиландеканоат.

[127] Липид D может быть изображен как:



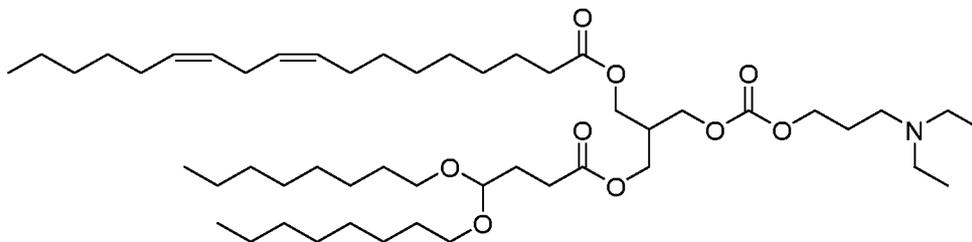
[128] Липид C и липид D могут синтезироваться согласно WO2015/095340.

[129] Липид CCD может также быть эквивалентен липиду A, липиду B, липиду C или липиду D. В определенных вариантах воплощения изобретения липид CCD является эквивалентным липиду A, эквивалентным липиду B, эквивалентным липиду C или эквивалентным липиду D.

[130] аминоклипыды

[131] В некоторых вариантах воплощения изобретения композиции LNP для доставки биологически активных агентов включают «аминоклипыды», который определен как липид A, липид B, липид C, липид D или эквивалентен липиду A (включая ацетильные аналоги липида A), эквивалентен липиду B, эквивалентен липиду C и эквивалентен липиду D.

[132] В некоторых вариантах воплощения изобретения аминоклипыды является липидом A: (9Z, 12Z)-3-(((4,4-бис (октилокси) бутаноил) окси)-2-(((3-(диэтиламино) пропокси) карбонил) окси) метил) пропил октадека-9,12-диеноат, также называемый 3-(((4,4-бис (октилокси) бутаноил) окси)-2-(((3-(диэтиламино) пропокси) карбонил) окси) метил) пропил (9Z, 12Z)-октадека-9,12-диеноат. Липид A может быть представлен как:



[133] Липид A может синтезироваться согласно WO2015/095340 (например, стр. 84-86). В определенных вариантах воплощения изобретения аминоклипыды является эквивалентным липиду A. В определенных вариантах воплощения изобретения аминоклипыды является аналогом липида A. В определенных вариантах воплощения аналог

липида А является ацетилованным аналогом липида А. В специфических композициях LNP ацетилованным аналогом являются C4-C12 ацетилованные аналоги.

[134] В некоторых вариантах воплощения изобретения ацетилованный аналог является C5-C12 ацетилованным аналогом. В дополнительных вариантах воплощения ацетилованный аналог является C5-C10 ацетилованным аналогом. В дальнейших вариантах воплощений ацетилованный аналог выбран из C4, C5, C6, C7, C9, C10, C11 и C12 ацетилованных аналогов.

[135] аминоклипыды, уместные для использования в LNP, представленных в этом документе, являются биоразлагаемыми в условиях *in vivo*. аминоклипыды характеризуются низкой токсичностью (например, толерантные в моделях на животных без отрицательного воздействия в количестве превышающем, или равном 10 мг/кг). В определенных вариантах воплощения LNP включают аминоклипыды, которые по меньшей мере на 75% являются аминоклипыдами, очищенными от плазмы в диапазоне 8, 10, 12, 24 или 48 часов, или 3, 4, 5, 6, 7 или 10 дней. В определенных вариантах воплощения изобретения LNP включают аминоклипыды, которые содержат по меньшей мере 50% мРНК или РНК гид, очищенные от плазмы в течение 8, 10, 12, 24 или 48 часов, или 3, 4, 5, 6, 7 или 10 дней. В определенных вариантах воплощения LNP включают аминоклипыды, которые по меньшей мере на 50% LNP очищены от плазмы в течение 8, 10, 12, 24, или 48 часов, или 3, 4, 5, 6, 7 или 10 дней, например, по содержанию липидов (например, аминоклипыдов), РНК (например, мРНК), или другого компонента. В определенных вариантах воплощения изобретения, определено содержание инкапсулированных липидов, по сравнению со свободными липидами, РНК, или компонентами нуклеиновой кислоты LNP.

[136] Клиренс липида может быть измерен, как описано в литературе. См. Maier, M.A., с соавторами «Biodegradable Lipids Enabling Rapidly Eliminated Lipid Nanoparticles for Systemic Delivery of RNAi Therapeutics». *Mol. Ther.* 2013, 21(8), 1570-78 («Maier»). Например, согласно методу Maier, системы LNP-siRNA, содержащие siRNA, таргетную к люциферазе, вводились шести - восьми недельным мышам-самцам линии C57B1/6 в концентрации 0,3 мг/кг внутривенной болюсной инъекцией в боковую вену хвоста. Собраны образцы крови, печени и селезенки через 0,083, 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 8, 24, 48, 96 и 168 часов после дозирования. Мыши перфузировались физиологическим раствором перед забором образцов ткани, и пробы крови были обработаны для получения плазмы. Все отобранные образцы были обработаны и проанализированы методом жидкостной хроматографии с масс-спектрометрией (LC-MS). Далее, Maier описывает методику оценки токсичности после введения составов LNP-siRNA. Например, siRNA, таргетная к люциферазе, вводилась в концентрации 0, 1, 3, 5, и 10 мг/кг (группе из 5 животных) в одной внутривенной болюсной инъекции в дозе объемом 5 мл/кг крысам-самцам линии Sprague-Dawley. Через 24 часа отбирали, приблизительно 1 мл крови из яремной вены животных, находившихся в сознании, и выделяли сыворотку. Через 72 часа после дозирования все животные подвергались эвтаназии для вскрытия трупа. Выполнялась оценка клинических симптомов, массы тела, биохимии сыворотки, массы органов и

гистопатологическое исследование. При том, что методы Maier разработаны для оценки составов siRNA-LNP, эти методы могут использоваться для оценки клиренса, фармакокинетики и токсичности вводимой композиции LNP, представляемого раскрытия изобретения.

[137] аминоклипыды повышают уровни клиренса. В некоторых вариантах воплощения изобретения уровнем клиренса является липидный клиренс, например, количество аминоклипыдов, полученных из крови, сыворотки или плазмы. В некоторых вариантах воплощения изобретения уровнем клиренса является количество РНК, полученных, например, из крови, сыворотки, или плазмы мРНК или gRNA. В некоторых вариантах воплощения изобретения уровень клиренса определяется по количеству LNP, очищенных из крови, сыворотки или плазмы. В некоторых вариантах воплощения изобретения уровень клиренса определяется по количеству LNP, очищенных из ткани, такой как ткань печени или селезенки. В определенных вариантах воплощения изобретения высокий уровень клиренса демонстрирует профиль безопасности без существенных отрицательных воздействий. аминоклипыды снижают накопление LNP в циркулирующей крови и в тканях. В некоторых вариантах воплощения изобретения снижение накопления LNP в циркулирующей крови и в тканях демонстрирует профиль безопасности без существенных отрицательных воздействий.

[138] аминоклипыды предлагаемого раскрытия могут ионизироваться в зависимости от pH среды, в которой они находятся. Например, в слабо кислой среде, аминоклипыды могут присоединять протон и таким образом нести положительный заряд. Наоборот, в слабо щелочной среде, такой как, например, кровь, где pH равняется приблизительно 7,35, аминоклипыды не протонируются и остаются нейтральными. В некоторых вариантах воплощения изобретения аминоклипыды предлагаемого раскрытия могут протонироваться при значениях pH по меньшей мере приблизительно 9. В некоторых вариантах воплощения изобретения аминоклипыды предлагаемого раскрытия могут протонироваться при значениях pH по меньшей мере приблизительно 9. В некоторых вариантах воплощения изобретения аминоклипыды предлагаемого раскрытия могут присоединять протон при значении pH по меньшей мере приблизительно 10.

[139] Способность аминоклипыда нести заряд определяется его характерной константой диссоциации (pKa). Например, у аминоклипыдов предлагаемого раскрытия может, у каждого независимо, быть pKa в диапазоне от приблизительно 5,8 до приблизительно 6,2. Например, у аминоклипыдов представленного раскрытия pKa может у каждого независимо, находиться в диапазоне от приблизительно 5,8 до приблизительно 6,5. Такое свойство может быть полезным, поскольку показано, что катионные липиды с pKa в диапазоне приблизительно от 5,1 до приблизительно 7,4 эффективны для доставки груза *in vivo*, например в печень. Далее, было найдено, что катионные липиды с pKa в диапазоне приблизительно от 5,3 до приблизительно 6,4 эффективны для доставки *in vivo*, например к опухолям. См., например, WO2014/136086.

[140] **Дополнительные липиды**

[141] «Нейтральные липиды», которые уместны для применения в композиции липида предлагаемого раскрытия, включают, например, множество нейтральных, незаряженных или цвиттер-ионных липидов. Примеры нейтральных фосфолипидов, уместных для использования в представленном изобретении, включают, но не ограничиваются, 5-гептадецилбензол-1,3-диол (резорцинол), дипальмитоил фосфатидилхолин (DPPC), дистеароил фосфатидилхолин (DSPC), фосфохолин (DOPC), димиристоил фосфатидилхолин (DMPC), фосфатидилхолин (PLPC), 1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфатидилхолин (DAPC), фосфатидилэтанолламин (PE), яичный фосфатидилхолин (EPC), дилаурило фосфатидилхолин (DLPC), димиристил фосфатидилхолин (DMPC), 1-миристоил-2-пальмитоил фосфатидилхолин (MPPC), 1-пальмитоил-2-миристоил фосфатидилхолин (PMPC), 1-пальмитоил-2-стеароил фосфатидилхолин (PSPC), 1,2-диарахидоил-sn-глицеро-3-фосфатидилхолин (DBPC), 1-стеароил-2-пальмитоил фосфатидилхолин (SPPC), 1, 2-диэйкозеноил-sn-глицеро-3-фосфохолин (DEPC), пальмитоолеил фосфатидилхолин (POPC), лизофосфатидил холин, диолеоил фосфатидилэтанолламин (DOPE), дилинеоил фосфатидилхолин, дистеароил фосфатидилэтанолламин (DSPE), димиристоил фосфатидилэтанолламин (DMPE), дипальмитоил фосфатидилэтанолламин (DPPE), пальмитоолеоил фосфатидилэтанолламин (POPE), лизофосфатидил этанолламин и его комбинации. В одном варианте воплощения нейтральный фосфолипид может быть выбран из группы, состоящей из дистеароил фосфатидилхолина (DSPC) и димиристоил фосфатидилэтанолламина (DMPE). В другом варианте воплощения изобретения нейтральный фосфолипид может быть дистеароил фосфатидилхолином (DSPC).

[142] «Липиды хелперы» включают стероиды, стерины и алкилированные резорцинолы. Липиды хелперы, которые уместны для использования в представленном раскрытии, включают, но не ограничиваются ими, холестерин, 5-гептадецилрезорцинол и холестерин гемисукцинат. В одном варианте воплощения изобретения липид хелпер может быть холестерином. В одном варианте воплощения изобретения липид хелпер может быть холестерин гемисукцинатом.

[143] «Липиды - невидимки» представлены липидами, которые влияют на время жизни наночастиц, которые могут присутствовать *in vivo* (например, в крови). Липиды невидимки могут помочь в процессе формирования состава, например, снижая агрегацию частиц и контролируя размер частиц. Липиды невидимки, представленные в этом документе, могут модулировать фармакокинетические свойства LNP. Липиды невидимки, уместные для использования в композиции раскрываемых липидов, включают, но не ограничиваются ими, липиды невидимки, имеющие основную гидрофильную главную группу, связанную с липидным остатком. Липиды невидимки, уместные для использования в композиции раскрываемых липидов и информация о биохимии таких липидов, представлены в публикации Romberg et al., *Pharmaceutical Research*, Vol. 25, No. 1, 2008, pg. 55-71 и Hoekstra et al., *Biochimica et Biophysica Acta* 1660 (2004) 41-52. Дополнительные уместные липиды PEG раскрыты, например, в WO 2006/007712.

[144] В одном варианте воплощения изобретения основная гидрофильная группа липида невидимки включает остаток полимера, выбранного из полимеров, группы полиэтиленгликоля (PEG). Липиды невидимки могут включить остаток липида. В некоторых вариантах воплощения изобретения липидом невидимкой является липид PEG.

[145] В одном варианте воплощения изобретения липид невидимка включает остаток полимера, выбранный из полимеров группы PEG (которые иногда называют поли-(этиленоксид)), поли-(оксазолин), поли-(виниловый спирт), поли-(глицерин), поли-(N-винилпирролидон), полиаминокислоты и поли-[N-(2-гидроксипропил) метакриламид].

[146] В одном варианте воплощения изобретения липид PEG включает остаток полимера из группы на PEG (иногда называемый поли-(этиленоксид)).

[147] Липид PEG также содержит остаток липида. В некоторых вариантах воплощения изобретения остаток липида может быть получен из диацилглицерола или диацилгликамида, включая те, которые содержат диалкилглицерольную или диалкилгликамидную группы, имеющую длину алкилированной цепи, независимо включающую от приблизительно C4 до приблизительно C40 насыщенных или ненасыщенных углеродных атомов, при этом цепь может включать одну или более функциональных групп, например, таких как, амид или сложный эфир. В некоторых вариантах воплощения изобретения длина алкилированной цепи включает от C10 до C20. Диалкилглицерольная или диалкилгликамидная группы могут также включать одну или более заменяемых алкилированных групп. Отрезки цепи могут быть симметричными или ассиметричными.

[148] Если иначе не указано, термин «PEG» в этом документе используется как любой полиэтиленгликоль или другой полиалкиленовый эфир полимера. В одном варианте воплощения изобретения PEG является линейным или разветвленным полимером, в котором необязательно заменен этилен гликоля или этиленоксид. В одном варианте воплощения PEG не заменяется. В одном варианте воплощения в PEG заменены, например, одним или более из алкила, алкокси, ацила, гидроксид или ариловых групп. В одном варианте воплощения термин включает сополимеры PEG, такие как PEG-полиуретан или PEG-полипропилен (смотрите, например, J. Milton Harris, Poly(ethylene glycol) chemistry: biotechnical and biomedical applications (1992)); в другом варианте воплощения изобретения термин не включает сополимеры PEG. В одном варианте воплощения молекулярная масса PEG составляет от приблизительно 130 до приблизительно 50 000; в одном варианте выполнения изобретения от приблизительно 150 до приблизительно 30 000; в подварианте от приблизительно 150 до приблизительно 20 000; в подварианте от приблизительно 150 до приблизительно 15 000; в подварианте от приблизительно 150 до приблизительно 10 000; в подварианте от приблизительно 150 до приблизительно 6 000; в подварианте от приблизительно 150 до приблизительно 5 000; в подварианте от приблизительно 150 до приблизительно 4 000; в подварианте от приблизительно 150 до приблизительно 3 000; в подварианте от приблизительно 300 до приблизительно 3 000; в подварианте от приблизительно 1 000 до приблизительно 3 000 и в подварианте от приблизительно 1 500

до приблизительно 2 500 дальтон.

[149] В некоторых вариантах воплощения PEG (например, конъюгированный с остатком липида или липидом, таким как липид невидимка) является «PEG-2K», который также называют «PEG 2000» со средней молекулярной массой приблизительно 2 000 дальтон. В настоящем документе PEG-2K представлен следующей формулой (I), где n 45, означает, что усредненный показатель степени полимеризации включает приблизительно 45 подгрупп. Однако в других вариантах воплощения изобретения могут использоваться другие современные технологии для PEG, включая, например, те, где усредненный показатель степени полимеризации включает приблизительно 23 подгрупп ($n=23$), и/или 68 подгрупп ($n=68$). В некоторых вариантах воплощения изобретения n может составлять от приблизительно 30 до приблизительно 60. В некоторых вариантах воплощения изобретения n может быть в диапазоне от приблизительно 35 до приблизительно 55. В некоторых вариантах воплощения изобретения n может быть в диапазоне от приблизительно 40 до приблизительно 50. В некоторых вариантах воплощения изобретения n может быть в диапазоне от приблизительно 42 до приблизительно 48. В некоторых вариантах воплощения изобретения n может быть 45. В некоторых вариантах воплощения изобретения R может быть выбран из H, заменяемой и незаменяемой алкильной группы. В некоторых вариантах воплощения изобретения R может быть незаменяемой алкильной группой. В некоторых вариантах воплощения изобретения R может быть метильной группой.

[150] В любом из вариантов воплощения изобретения, представленных в этом документе, липид PEG может быть выбран из PEG-дилауроилглицерола, PEG-димиристоилглицерола (PEG-DMG) (каталожный № GM 020 от NOF, Токио, Япония), PEG-дипальмитоилглицерола, PEG-дистериоилглицерола (PEG-DSPE) (каталожный № DSPE-020CN, NOF, Токио, Япония), PEG-дилаурилгликамида, PEG-димиристилгликамида, PEG-дипальмитоилгликамида и PEG-дистероилгликамида, PEG-холестерин (1-[8'-(Холест-5-ен-3 [бета]-окси) карбоксамидо-3', 6'-диоксаоктанил]карбомоил-[омега]-метил поли-(гликоль этилена), PEG-DMB (3,4-тетрадекоксибензил-[омега] - эфира метил поли-(гликоль этилена), 1,2-димиристоил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин-N-[метокси (гликоль полиэтилен)-2000] (PEG2k-DMG) (каталожный № 880150P из полярных липидов Avanti, Alabaster, Alabama, США), 1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин -N-[метокси (гликоль полиэтилен)-2000] (PEG2k-DSPE) (каталожный № 880120C из полярных липидов Avanti, Alabaster, Alabama, США), 1,2-дистеароил-sn-глицерол, метоксиполиэтилен гликоль (PEG2k-DSG; GGS-020, NOF Токио, Япония), поли-(гликоль этилена)-2000-диметакрилат (PEG2k-DMA), и 1,2-дистеароилоксипропил-3-амин-N-[метокси (гликоль полиэтилен)-2000] (PEG2k-DSA). В одном варианте воплощения липидом для PEG может быть PEG2k-DMG. В некоторых вариантах воплощения изобретения липидом для PEG может быть PEG2k-DSG. В одном варианте воплощения липидом для PEG может быть PEG2k-DSPE. В одном варианте воплощения изобретения липидом для PEG может быть PEG2k-DMA. В одном воплощении липидом для PEG может быть PEG2k-C-DMA. В одном

варианте воплощения изобретения липидом PEG может быть композиция S027, раскрытая в WO2016/010840 (параграфы от [00240] до [00244]). В одном варианте воплощения липидом для PEG может быть PEG2k-DSA. В одном варианте воплощения липидом для PEG может быть PEG2k-C11. В некоторых вариантах воплощения изобретения липидом для PEG может быть PEG2k-C14. В некоторых вариантах воплощения изобретения липидом для PEG может быть PEG2k-C16. В некоторых вариантах воплощения изобретения липидом для PEG может быть PEG2k-C18.

[151] Составы LNP

[152] LNP может включать (i) аминоклипид для инкапсуляции и для эндосомального высвобождения, (ii) нейтральный липид для стабилизации, (iii) липид хелпер, также для стабилизации, и (iv) липид невидимку, такой как липид PEG.

[153] В некоторых вариантах воплощения изобретения композиция LNP может включать компонент РНК, который содержит один или более агентов, связывающих РНК гид с ДНК, мРНК нуклеазы Cas, мРНК нуклеазы Cas Класса 2, мРНК Cas9 и gRNA.

[154] В некоторых вариантах воплощения изобретения композиция LNP может включать нуклеазу Cas Класса 2 и gRNA как компонент РНК. В определенных вариантах воплощения композиция LNP может включать компонент РНК, липид амина, липид хелпер, нейтральный липид и липид невидимку. В некоторых композициях LNP липидом хелпером является холестерин. В других композициях нейтральным липидом является DSPC. В дополнительных вариантах воплощения изобретения липидом невидимкой являются PEG2k-DMG или PEG2k-C11. В определенных вариантах воплощения композиция LNP включает липид А или эквивалент липида А; липид хелпер; нейтральный липид; липид невидимку и РНК гида. В определенных композициях аминоклипидом является липид А. В определенных композициях аминоклипидом является липид А или его ацетилированный аналог; липидом хелпером является холестерин; нейтральным липидом является DSPC и липидом невидимкой является PEG2k-DMG.

[155] В определенных вариантах воплощения изобретения композиции липидов представлены согласно соответствующим молярным соотношениям липидных компонентов в составе. В вариантах воплощения представленного изобретения представлены композиции липидов согласно соответствующим молярным соотношениям липидного компонента в составе. В одном варианте воплощения содержание аминоклипида в моль% может быть от приблизительно 30 моль% до приблизительно 60 моль%. В одном варианте воплощения изобретения моль% аминоклипида может быть от приблизительно 40 моль% до приблизительно 60 моль%. В одном варианте моль% аминоклипида может быть от приблизительно 45 моль% до приблизительно 60 моль%. В одном варианте воплощения изобретения содержание аминоклипида в моль% может быть от приблизительно 50 моль% до приблизительно 60 моль%. В одном варианте воплощения изобретения содержание аминоклипида в моль% может быть от приблизительно 55 моль% до приблизительно 60 моль%. В одном варианте воплощения изобретения содержание аминоклипида в моль% может быть от приблизительно 50 моль% до приблизительно 55 моль%. В одном варианте

воплощения изобретения содержание аминоклипида в моль% может быть приблизительно 50 моль%. В одном варианте воплощения изобретения содержание аминоклипида в моль% может быть приблизительно 55 моль%. В некоторых вариантах воплощения изобретения содержание аминоклипида в моль% для серии LNP может быть $\pm 30\%$, $\pm 25\%$, $\pm 20\%$, $\pm 15\%$, $\pm 10\%$, $\pm 5\%$ или $\pm 2,5\%$ от заданных значений моль%. В некоторых вариантах воплощения изобретения содержание аминоклипида в моль% для серии LNP будет ± 4 моль%, ± 3 моль%, ± 2 моль%, $\pm 1,5$ моль%, ± 1 моль%, $\pm 0,5$ моль% или $\pm 0,25$ моль% от заданных значений моль%. Все количества в моль% представлены как молярная доля липидного компонента в составе LNP. В некоторых вариантах воплощения изобретения вариативность моль% аминоклипида между партиями LNP в композиции составляет менее 15%, менее 10% или менее 5%.

[156] В одном варианте воплощения содержание нейтрального липида в моль% может быть от приблизительно 5 моль% до приблизительно 15 моль%. В одном варианте воплощения содержание нейтрального липида в моль% может быть от приблизительно 7 моль% до приблизительно 12 моль%. В одном варианте воплощения изобретения содержание нейтрального липида в моль% может быть приблизительно 9 моль%. В некоторых вариантах воплощения изобретения содержание нейтрального липида в серии LNP может быть $\pm 30\%$, $\pm 25\%$, $\pm 20\%$, $\pm 15\%$, $\pm 10\%$, $\pm 5\%$ или $\pm 2,5\%$ от заданных значений нейтрального липида в моль%. В некоторых вариантах воплощения изобретения вариативность в моль% между партиями LNP в композиции составляет менее 15%, менее 10% или менее 5%.

[157] В одном варианте воплощения изобретения содержание липида хелпера в моль% может составлять от приблизительно 20 моль% до приблизительно 60 моль%. В одном варианте воплощения содержание липида хелпера в моль% может быть от приблизительно 25 моль% до приблизительно 55 моль%. В одном варианте воплощения изобретения содержание липида хелпера моль% может быть от приблизительно 25 моль% до приблизительно 50 моль%. В одном варианте воплощения изобретения содержание липида хелпера в моль% может быть от приблизительно 25 моль% до приблизительно 40 моль%. В одном варианте воплощения изобретения содержание липида хелпера в моль% может быть от приблизительно 30 моль% до приблизительно 50 моль%. В одном варианте воплощения изобретения содержание липида хелпера в моль% может быть от приблизительно 30 моль% до приблизительно 40 моль%. В одном варианте воплощения изобретения содержание липида хелпера в моль% уравнивается на основании содержания аминоклипида, нейтрального липида, и концентрациях липида PEG, чтобы довести содержание липида до 100 моль%. В некоторых вариантах воплощения изобретения содержание липида хелпера в моль% в серии LNP может быть $\pm 30\%$, $\pm 25\%$, $\pm 20\%$, $\pm 15\%$, $\pm 10\%$, $\pm 5\%$ или $\pm 2,5\%$ от заданных значений липида хелпера в моль%. В некоторых вариантах воплощения изобретения вариативность в моль% между партиями LNP в составе составляет менее 15%, менее 10% или менее 5%.

[158] В одном варианте воплощения изобретения содержание липида PEG в моль%

может быть от приблизительно 1 моль% до приблизительно 10 моль% . В одном варианте воплощения изобретения содержание липида PEG в моль% может быть от приблизительно 2 моль% до приблизительно 10 моль% . В одном варианте воплощения изобретения содержание липида PEG в моль% может быть от приблизительно 2 моль% до приблизительно 8 моль% . В одном варианте воплощения изобретения содержание липида PEG в моль% может быть от приблизительно 2 моль% до приблизительно 4 моль%. В одном варианте воплощения изобретения содержание липида PEG в моль% может быть от приблизительно 2,5 моль% до приблизительно 4 моль%. В одном варианте воплощения изобретения содержание липида PEG в моль% может быть приблизительно 3 моль%. В одном варианте воплощения изобретения содержание липида PEG в моль% может быть приблизительно 2,5 моль%. В некоторых вариантах воплощения изобретения содержание липида PEG в серии LNP может быть $\pm 30\%$, $\pm 25\%$, $\pm 20\%$, $\pm 15\%$, $\pm 10\%$, $\pm 5\%$ или $\pm 2,5\%$ от заданных значений липида PEG в моль%. В некоторых вариантах воплощения изобретения вариабельность в моль% между партиями LNP в составе составляет менее 15%, менее 10% или менее 5%.

[159] В определенных вариантах воплощения изобретения специфическая нагрузка включает мРНК, агент кодирующий РНК гид с ДНК (например, нуклеазу Cas, нуклеазу Cas Класса 2, или Cas9), и РНК гид или нуклеиновую кислоту, кодирующую РНК гид, или комбинацию мРНК и РНК гид. В одном варианте воплощения изобретения композиция LNP может включать липид А или его эквиваленты. В нескольких аспектах аминолипидом является липид А. В нескольких аспектах аминолипидом является эквивалентный аналог липида А. В нескольких аспектах аминолипидом является ацетилированный аналог липида А. В различных вариантах воплощения изобретения композиция LNP включает аминолипид, нейтральный липид, липид хелпер и липид PEG. В некоторых вариантах воплощения липидом хелпером является холестерин. В некоторых вариантах воплощения изобретения нейтральным липидом является DSPC. В некоторых вариантах воплощения изобретения липидом PEG является PEG2k-DMG. В некоторых вариантах воплощения изобретения композиция LNP может включать липид А, липид хелпер, нейтральный липид и липид PEG. В некоторых вариантах воплощения изобретения композиция LNP включает аминолипид, DSPC, холестерин и липид PEG. В некоторых вариантах воплощения изобретения композиция LNP содержит липид PEG, включающий DMG. В отдельных вариантах воплощениях аминолипид выбран из липида А и эквивалента липида А, включая ацетилированный аналог липида А. В дополнительных вариантах воплощения композиция LNP включает липид А, холестерин, DSPC и PEG2k-DMG.

[160] В вариантах воплощения представленного изобретения композиции липида также представлены согласно молярному соотношению между положительно заряженными группами аминолипида (N) и отрицательно заряженными группами фосфата (P) инкапсулированной нуклеиновой кислоты. Математически это может быть представлено уравнением N/P. В некоторых вариантах воплощения изобретения композиция LNP может содержать липидный компонент, который включает аминолипид,

липид хелпер, нейтральный липид и липид хелпера; а также компонент нуклеиновой кислоты, в котором отношение N/P составляет от приблизительно 3 до 10. В некоторых вариантах воплощения изобретения композиция LNP может содержать липидный компонент, который включает аминоклипид, липид хелпер, нейтральный липид и липид хелпера; а также компонент нуклеиновой кислоты, в котором отношение N/P составляет от приблизительно 3 до 10. В одном варианте воплощения изобретения отношения N/P могут быть приблизительно 5-7. В одном варианте воплощения изобретения отношения N/P могут быть приблизительно 4,5-8. В одном варианте воплощения изобретения отношения N/P могут быть приблизительно 6. В одном варианте воплощения изобретения отношения N/P могут быть 6 ± 1 . В одном варианте воплощения изобретения отношения N/P могут быть приблизительно $6 \pm 0,5$. В некоторых вариантах воплощения изобретения отношение N/P может быть $\pm 30\%$, $\pm 25\%$, $\pm 20\%$, $\pm 15\%$, $\pm 10\%$, $\pm 5\%$ или $\pm 2,5\%$ от заданных значений отношения N/P. В некоторых вариантах воплощения изобретения вариабельность между партиями LNP в композиции составляет менее 15%, менее 10% или менее 5%.

[161] В некоторых вариантах воплощения изобретения компонент РНК может включать мРНК, такую как мРНК, раскрытая в этом документе, например, кодирующую нуклеазу Cas. В одном варианте воплощения компонент РНК может включать мРНК Cas9. В некоторых композициях, включающих мРНК, кодирующую нуклеазу Cas, LNP дополнительно включает gRNA нуклеиновой кислоты, такую как gRNA.

В некоторых вариантах воплощения изобретения компонент РНК включает мРНК нуклеазы Cas и gRNA. В некоторых вариантах воплощения изобретения компонент РНК включает мРНК нуклеазы Cas Класса 2 и gRNA.

[162] В некоторых вариантах воплощения композиция LNP может включать мРНК, раскрытую в этом документе, например, кодирующую нуклеазу Cas, такую как нуклеаза Cas Класса 2, аминоклипид, липид хелпер, нейтральный липид и липид PEG. В отдельных композициях LNP, включающих мРНК, кодирующую нуклеазу Cas, такую как нуклеаза Cas Класса 2, липидом хелпером является холестерин. В других композициях, включающих мРНК, кодирующую нуклеазу Cas, такую как нуклеаза Cas Класса 2, нейтральным липидом является DSPC. В дополнительных вариантах воплощения изобретения, включающих мРНК, кодирующую нуклеазу Cas, такую как нуклеаза Cas Класса 2, липид PEG является PEG2k-DMG или PEG2k-C11. В отдельных композициях, включающих мРНК, кодирующую нуклеазу Cas, такую как нуклеаза Cas Класса 2, аминоклипид выбран из липида А и его эквивалентов, таких как ацетилованные аналоги липида А.

[163] В некоторых вариантах воплощения изобретения композиция LNP может включать gRNA. В отдельных вариантах воплощения композиция LNP может включать аминоклипид, gRNA, липид хелпер, нейтральный липид и липид PEG. В отдельных композициях LNP, включающих gRNA, липидом хелпером является холестерин. В некоторых композициях, включающих gRNA, нейтральным липидом является DSPC. В дополнительных вариантах воплощения, включающих gRNA, липидом PEG является PEG2k-DMG или PEG2k-C11. В отдельных вариантах воплощения аминоклипид выбран из

липида А и его эквивалентов, таких как ацетилированные аналоги липида А.

[164] В одном варианте воплощения композиция LNP может включать sgRNA. В одном варианте воплощения композиция LNP может включать Cas9 sgRNA. В одном варианте воплощения композиция LNP может включать Cpf1 sgRNA. В некоторых композициях, включающих sgRNA, LNP содержит аминоклипид, липид хелпер, нейтральный липид и липид PEG. В отдельных композициях, включающих sgRNA, липидом хелпером является холестерин. В других композициях, включающих sgRNA, нейтральным липидом является DSPC. В дополнительных вариантах воплощения, включающих sgRNA, липидом PEG является PEG2k-DMG или PEG2k-C11. В отдельных вариантах воплощения аминоклипид выбран из липида А и его эквивалентов, таких как ацетилированные аналоги липида А.

[165] В определенных вариантах воплощения композиция LNP включает мРНК, кодирующую нуклеазу Cas и gRNA, которая может быть sgRNA. В одном варианте воплощения композиция LNP может включать аминоклипид, мРНК, кодирующую нуклеазу Cas, gRNA, липид хелпер, нейтральный липид и липид PEG. В отдельных композициях, включающих мРНК, кодирующую нуклеазу Cas и gRNA, липидом хелпером является холестерин. В некоторых композициях, включающих мРНК, кодирующую нуклеазу Cas и gRNA, нейтральным липидом является DSPC. В дополнительных вариантах воплощения, включающих мРНК, кодирующую нуклеазу Cas и gRNA, липидом PEG являются PEG2k-DMG или PEG2k-C11. В отдельных вариантах воплощения аминоклипид выбран из липида А и его эквивалентов, таких как ацетилированные аналоги липида А.

[166] В отдельных вариантах воплощения изобретения композиции LNP включают мРНК нуклеазы Cas, такую как мРНК Cas Класса 2 и по меньшей мере одну gRNA. В отдельных вариантах воплощения композиция LNP включает отношение gRNA к мРНК нуклеазы Cas, такой как мРНК нуклеазы Cas Класса 2 от приблизительно 25:1 до приблизительно 1:25. В отдельных вариантах воплощения композиция LNP включает отношение gRNA к мРНК нуклеазы Cas, такой как мРНК нуклеазы Cas Класса 2 от приблизительно 10:1 до приблизительно 1:10. В отдельных вариантах воплощения композиция LNP включает отношение gRNA к мРНК нуклеазы Cas, такой как мРНК нуклеазы Cas Класса 2 от приблизительно 8:1 до приблизительно 1:8. Согласно измерениям, представленным в этом документе, отношения являются массой. В некоторых вариантах воплощения изобретения композиция LNP включает отношение gRNA к мРНК нуклеазы Cas, такой как мРНК Cas Класса 2 от приблизительно 5:1 до приблизительно 1:5. В некоторых вариантах воплощения изобретения, диапазон отношения составляет: от приблизительно 3:1 до 1:3; от приблизительно 2:1 до 1:2; от приблизительно 5:1 до 1:2, от приблизительно 5:1 до 1:1, от приблизительно 3:1 до 1:2, от приблизительно 3:1 до 1:1, приблизительно 3:1, от приблизительно 2:1 до 1:1. В некоторых вариантах воплощения изобретения отношение gRNA к мРНК составляет приблизительно 3:1 или приблизительно 2:1. В некоторых вариантах воплощения отношение gRNA к мРНК нуклеазы Cas, такой как нуклеаза Cas Класса 2 составляет приблизительно 1:1. Отношение может быть

приблизительно 25:1, 10:1, 5:1, 3:1, 1:1, 1:3, 1:5, 1:10 или 1:25.

[167] Композиции LNP, раскрытые в этом документе, могут включать матрицу нуклеиновой кислоты. Матрица нуклеиновой кислоты может быть сформирована совместно с мРНК, кодирующей нуклеазу Cas, такой как мРНК нуклеазы Cas Класса 2. В некоторых вариантах воплощения изобретения матрица нуклеиновой кислоты может быть совместно сформирована с РНК гида. В некоторых вариантах воплощения изобретения матрица нуклеиновой кислоты может быть сформирована совместно с мРНК, кодирующей нуклеазу Cas и с РНК гида. В некоторых вариантах воплощения изобретения матрица нуклеиновой кислоты может быть сформирована отдельно от мРНК, кодирующей нуклеазу Cas или РНК гида. Матрица нуклеиновой кислоты может быть доставлена с композицией LNP, или отдельно. В некоторых вариантах воплощения изобретения матрица нуклеиновой кислоты может быть одноцепочечной или двухцепочечной, в зависимости от предполагаемого механизма репарации. Матрица может включать области гомологичные таргетной ДНК, или к последовательностям, граничащим с таргетной ДНК.

[168] В некоторых вариантах воплощения изобретения LNP сформированы при смешивании водного раствора РНК с раствором липидов в органическом растворителе, например, 100% этаноле. Уместные растворы или растворители включают или могут содержать: воду, фосфатно-солевой буфер (PBS), Трис буфер, NaCl, цитратный буфер, этанол, хлороформ, диэтиловый эфир, циклогексан, тетрагидрофуран, метанол, изопропанол. Может использоваться фармацевтически приемлемый буфер, например, для *in vivo* введения LNP. В некоторых вариантах воплощения буфер используется для поддержки pH композиции, включающей LNP, на уровне 6,5, или выше. В некоторых вариантах воплощения буфер используется для поддержки pH композиции, включающей LNP, на уровне 7,0, или выше. В некоторых вариантах воплощения буфер используется для поддержки pH композиции, включающей LNP, диапазон pH от приблизительно 7,2 до приблизительно 7,7. В дополнительных вариантах воплощения изобретения pH композиции находится в диапазоне от приблизительно 7,3 до приблизительно 7,7 или в диапазоне от приблизительно 7,4 до приблизительно 7,6. В последующих вариантах воплощения pH композиции равняется приблизительно 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, или 7,7. Показатели pH композиции могут быть измерены с помощью микрометода. В некоторых вариантах воплощения изобретения в композицию включен криоконсервант. Примеры криоконсервантов включают, но не ограничиваются ими, сахарозу, трегалазу, глицерин, диметилсульфоксид и этиленгликоль. Иллюстративные композиции могут включать до 10% криоконсерванта, например, сахарозу. В отдельных вариантах воплощения композиция LNP может включать приблизительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10% криоконсерванта. В отдельных вариантах воплощения композиция LNP может включать приблизительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10% сахарозы. В некоторых вариантах воплощения изобретения композиция LNP может включать буфер. В некоторых вариантах воплощения изобретения буфер может включать фосфатный буфер (PBS), Трис буфер, цитратный буфер или их смеси. В некоторых иллюстративных вариантах воплощения изобретения буфер

включает NaCl. В некоторых вариантах воплощения NaCl не включался. Иллюстративное количество NaCl может быть в диапазоне концентраций от приблизительно 20 мМ до приблизительно 45 мМ. Иллюстративное количество NaCl может быть в диапазоне концентраций от приблизительно 40 мМ до приблизительно 50 мМ. В некоторых вариантах воплощения изобретения количество NaCl в композиции составляет приблизительно 45 мМ. В некоторых вариантах воплощения изобретения буфером является Трис буфер. Иллюстративное количество Триса может быть в диапазоне от приблизительно 20 мМ до приблизительно 60 мМ. Иллюстративное количество Триса может быть в диапазоне от приблизительно 40 мМ до приблизительно 60 мМ. В некоторых вариантах воплощения изобретения количество Триса в композиции составляет приблизительно 50 мМ. В некоторых вариантах воплощения изобретения буфер включает NaCl и Трис. Отдельные иллюстративные варианты композиции LNP содержат 5% сахарозу и 45 мМ NaCl в Трис буфере. В других иллюстративных вариантах композиции содержится сахароза в количестве приблизительно 5% вес/объем, приблизительно 45 мМ NaCl и приблизительно 50 мМ Трис при pH 7,5. Количества соли, буфера и криоконсерванта могут быть различными для поддержки общей осмоляльности состава. Например, заключительная осмоляльность может поддерживаться на уровне менее 450 мОсм/л. В дальнейших вариантах воплощения осмоляльность равняется между 350 и 250 мОсм/л. У некоторых вариантах воплощения заключительная осмоляльность составляет 300 ± 20 мОсм/л.

[169] В некоторых вариантах воплощения используется микрофлюидное смешивание, Т-смешивание или перекрестное смешивание. В определенных аспектах могут различаться скорости потока, размер соединения, геометрия соединения, форма соединения, диаметр трубки, растворы, и/или концентрации РНК и липида. LNP или композиция LNP могут быть сконцентрированы или очищены, например, с помощью диализа, фильтрации в тангенциальном потоке или хроматографией. LNP могут храниться как суспензия, эмульсия или лиофилизированный порошок, например. В некоторых вариантах воплощения изобретения композиция LNP хранится при температуре 2-8°C, в определенных аспектах, композиции LNP хранятся при комнатной температуре. В дополнительных вариантах воплощения композиция LNP сохраняется замороженной, например, при минус 20°C или при минус 80°C. В других вариантах воплощения композиция LNP хранится при температуре в диапазоне от приблизительно 0°C до приблизительно минус 80°C. Замороженные составы LNP перед использованием могут оттаиваться, например, на льду, при 4°C, при комнатной температуре или при 25°C. Замороженные композиции LNP могут выдерживаться при различных температурах, например на льду, при 4°C, при комнатной температуре, при 25°C или при 37°C.

[170] В некоторых вариантах воплощения изобретения композиция LNP может быть инкапсулирована больше чем приблизительно на 80%. В некоторых вариантах воплощения изобретения композиция LNP характеризуется размером частиц менее чем приблизительно 120 нм. В некоторых вариантах воплощения изобретения коэффициент полидисперсности композиции (pdi) LNP составляет меньше, чем приблизительно 0,2. В некоторых вариантах

воплощения изобретения присутствуют по меньшей мере две из этих характеристик. В некоторых вариантах воплощения изобретения присутствует каждая из этих трех характеристик. Аналитические способы, используемые для определения этих параметров, обсуждены ниже в общем разделе реактивов и методов.

[171] В некоторых вариантах воплощения используется микрофлюидное смешивание, Т-смешивание, или перекрестное смешивание. В определенных аспектах могут различаться скорости потока, параметры соединения, геометрия соединения, диаметр трубки, растворы, и/или концентрации РНК и липида. LNP или композиции LNP могут быть сконцентрированы или очищены, например, с помощью диализа или хроматографии. LNP могут храниться как суспензия, эмульсия, или лиофилизированный порошок, например. В некоторых вариантах воплощения изобретения композиция LNP хранится при температуре 2-8°C, в определенных аспектах, композиции LNP хранятся при комнатной температуре. В дополнительных вариантах воплощения композиция LNP сохраняется замороженной, например, при минус 20°C или при минус 80°C. В других вариантах воплощения композиция LNP хранится при температуре в диапазоне от 0°C до минус 80°C. Замороженные составы LNP перед использованием могут оттаиваться, например, на льду, при комнатной температуре или при 25°C.

[172] Метод динамического рассеивания света («DLS»), может использоваться для характеристики коэффициента полидисперсности (« PDI ») и размера LNP в представленном раскрытии изобретения. Методом DLS измеряется рассеивание света образцом, помещенным в источник света. Показатель PDI определяется из результатов DLS и представляет распределение частиц по размеру (относительно среднего размера частиц) в смеси, по сравнению с однородным контролем, с PDI равным 0. В некоторых вариантах воплощения изобретения показатель PDI может колебаться от 0,005 до 0,75. В некоторых вариантах воплощения изобретения показатель PDI может колебаться от 0,01 до 0,5. В некоторых вариантах воплощения изобретения показатель PDI может колебаться от 0,02 до 0,4. В некоторых вариантах воплощения изобретения показатель PDI может колебаться от 0,03 до 0,35. В некоторых вариантах воплощения изобретения показатель PDI может колебаться от 0,1 до 0,35.

[173] В некоторых вариантах воплощения изобретения LNP, раскрытые в данном документе, имеют размер от 1 до 250 нм. В некоторых вариантах воплощения изобретения размер LNP составляет от 10 до 200 нм. В дополнительных вариантах воплощения изобретения размер LNP составляет от 20 до 150 нм. В некоторых вариантах воплощения изобретения размер LNP составляет от 50 до 150 нм. В некоторых вариантах воплощения изобретения размер LNP составляет от 50 до 100 нм. В некоторых вариантах воплощения изобретения размер LNP составляет от 50 до 120 нм. В некоторых вариантах воплощения изобретения размер LNP составляет от 75 до 150 нм. В некоторых вариантах воплощения изобретения размер LNP составляет от 30 до 200 нм. Если не указано иначе, все размеры, упомянутые в данном документе, являются средними размерами (диаметр) полностью сформированных наночастиц, как измерено методом динамического рассеивания на

установке Malvern Zetasizer. Образец наночастиц разводится забуференным солевым раствором (PBS) таким образом, чтобы показатель угла рассеивания к углу распределения составлял приблизительно 200-400 kcts. Данные представлены как нормированная средняя величина от измеренной интенсивности. В некоторых вариантах воплощения изобретения, усредненная эффективность включения в LNP составляет от 50 до 100%. В некоторых вариантах воплощения изобретения, усредненная эффективность включения в LNP составляет от 50 до 70%. В некоторых вариантах воплощения изобретения усредненная эффективность включения в LNP составляет от 70 до 90%. В некоторых вариантах воплощения изобретения, средняя эффективность включения в LNP оставляет от 90 до 100%. В некоторых вариантах воплощения изобретения, средняя эффективность включения в LNP оставляет от 75 до 95%.

[174] В некоторых вариантах воплощения изобретения, LNP, включающие gRNA, раскрытые в представленном документе, являются лекарственной формой для лечения ATTR. В некоторых вариантах воплощения изобретения, LNP, включающие gRNA, раскрытые в представленном документе, являются лекарственной формой для снижения или предотвращения накопления и агрегации TTR в амилоидах или амилоидных фибриллах у субъектов, имеющих ATTR. В некоторых вариантах воплощения изобретения, LNP, включающие gRNAs, раскрытые в представленном документе, являются лекарственной формой для снижения концентрации TTR в сыворотке. В некоторых вариантах воплощения изобретения, LNP, включающие gRNA, раскрытые в представленном документе, являются лекарственной формой для использования в лечении ATTR у субъекта, например, у млекопитающего, например примата, такого как человек. В некоторых вариантах воплощения изобретения, LN, включающие gRNA, раскрытые в представленном документе, являются лекарственной формой, используемой для снижения или предотвращения накопления и агрегации TTR в амилоидах или амилоидных фибриллах у субъектов, имеющих ATTR, таких как млекопитающие, например примат, такой как человек. В некоторых вариантах воплощения изобретения, LNP, включающие gRNA, раскрытые в представленном документе, являются лекарственной формой для снижения концентрации TTR в сыворотке у субъекта, такого как млекопитающее, например, примат, такой как человек.

[175] Электропорация также является известным подходом для доставки, поэтому любой метод электропорации может использоваться для доставки любой из раскрытых в представляемом документе gRNA. В некоторых вариантах воплощения изобретения электропорация может использоваться для доставки любой из gRNA, раскрытых в документе и РНК гида нуклеазы ДНК, такой как Cas9 или мРНК, кодирующей РНК гид нуклеазы ДНК, такой как Cas9.

[176] В некоторых вариантах воплощения изобретения, изобретение включает подход для доставки любой из раскрытых в представляемом документе gRNA, в клетки *ex vivo*, в которых gRNA связана, или не связана с LNP. В некоторых вариантах воплощения изобретения, gRNA/LNP или gRNA также связаны с РНК гидом нуклеазы ДНК, такой как

Cas9 или мРНК, кодирующей РНК гид нуклеазы ДНК, такой как Cas9.

[177] В некоторых вариантах воплощения, изобретение включает векторы ДНК или векторы РНК, кодирующие любую из РНК гид, включающих одну или более из последовательностей гида, представленных в этом документе. В некоторых вариантах воплощения изобретения, в дополнении к последовательности РНК гида, векторы дополнительно включают нуклеиновые кислоты, которые не кодируют РНК гид. Нуклеиновые кислоты, которые не кодируют РНК гид, включают, но не ограничиваются ими, промоторы, энхансеры, регуляторные последовательности и нуклеиновые кислоты, кодирующие РНК гид нуклеазы ДНК, которая может быть Cas9 нуклеазой. В некоторых вариантах воплощения изобретения вектор включает одну или более из последовательностей нуклеотида, кодирующих crRNA, trRNA, или crRNA и trRNA. В некоторых вариантах воплощения изобретения вектор включает одну или более из последовательностей нуклеотида, кодирующих sgRNA и мРНК, кодирующих РНК гид нуклеазы ДНК, которая может быть нуклеазой Cas, такой как Cas9 или Cpf1. В некоторых вариантах воплощения изобретения вектор включает одну или более из последовательностей нуклеотида, кодирующих crRNA, trRNA, и мРНК, кодирующую РНК гид нуклеазы ДНК, которая может быть белком Cas, таким как, Cas9. В одном варианте воплощения изобретения Cas9 может быть из *Streptococcus pyogenes* (то есть, Spy Cas9). В некоторых вариантах воплощения изобретения последовательность нуклеотида, кодирующая crRNA, trRNA, или crRNA и trRNA (которая может быть sgRNA), включает или состоит из последовательности гида, граничащей полностью или частично с повторяющейся последовательностью из естественно - встречающейся системы CRISPR/Cas. Нуклеиновая кислота, содержащая или состоящая из crRNA, trRNA, или crRNA и trRNA может дополнительно включать векторную последовательность, отличающуюся тем, что векторная последовательность включает или состоит из нуклеиновых кислот, которые естественно не встречаются вместе с crRNA, trRNA, или crRNA и trRNA.

[178] В некоторых вариантах воплощения изобретения crRNA и trRNA закодированы незаменимыми нуклеиновыми кислотами в пределах одного вектора. В других вариантах воплощения crRNA и trRNA могут кодироваться перекрывающейся нуклеиновой кислотой. В некоторых вариантах воплощения изобретения crRNA и trRNA кодируются противоположными нитями однонитевой нуклеиновой кислоты. В других вариантах воплощения изобретения crRNA и trRNA кодируются теми же нитями однонитевой нуклеиновой кислоты.

[179] В некоторых вариантах воплощения изобретения вектор может быть кольцевым. В других вариантах воплощения изобретения вектор может быть линейным. В некоторых вариантах воплощения изобретения вектор может быть включен в наночастицы липида, липосомы, нелипидные наночастицы или в вирусные капсиды. Иллюстративные примеры векторов включают, но не ограничиваются ими, плазмиды, фагемиды, космиды, искусственные хромосомы, минихромосомы, транспозоны, вирусные векторы и векторы

экспрессии.

[180] В некоторых вариантах воплощения изобретения вектор может быть вирусным вектором. В некоторых вариантах воплощения изобретения вирусный вектор может быть генетически модифицирован из своего «дикого» типа. Например, вирусный вектор может включать инсерцию, делецию или замену одного или более из нуклеотидов для оптимизации клонирования или таким образом, чтобы модифицировать одно или более свойств вектора. Такие свойства могут включать способность к свертыванию, эффективность трансдукции, иммуногенность, геномную интеграцию, репликацию, транскрипцию и трансляцию. В некоторых вариантах воплощения изобретения часть вирусного генома может быть удалена таким образом, чтобы повысить накопление вирусом экзогенных последовательностей большего размера. В некоторых вариантах воплощения изобретения у вирусного вектора может быть повышена эффективность трансдукции. В некоторых вариантах воплощения изобретения может быть снижен иммунный ответ, индуцированный вирусом в организме. В некоторых вариантах воплощения, вирусный геном (например, интегразы), который промотирует интеграцию вирусной последовательности в геном хозяина, может быть мутирован таким образом, что вирус теряет способность к интеграции. В некоторых вариантах воплощения изобретения вирусный вектор может реплицироваться как дефектный. В некоторых вариантах воплощения изобретения вирусный вектор может включать экзогенные транскрипционные или трансляционные контрольные последовательности для обеспечения экспрессии кодирования последовательностей на векторе. В некоторых вариантах воплощения изобретения вирус может зависеть от хелпера. Например, для вируса, возможно, требуется один или более вирусов - хелперов для доставки вирусных компонентов (например, вирусных белков), необходимых для амплификации и упаковки векторов в вирусные частицы. В таком случае один или более компонентов хелпера, включающих один или более из векторов, кодирующих вирусные компоненты, могут быть введены в клетку хозяина вместе с векторной системой, представленной в данном документе. В других вариантах воплощения вирус может не включать хелперов. Например, вирус может быть способен совершать амплификацию и упаковку векторов без помощи вируса хелпера. В некоторых вариантах воплощения изобретения векторная система, представленная в данном документе, может также кодировать вирусные компоненты, необходимые для амплификации и упаковки вируса.

[181] Иллюстративные примеры вирусных векторов включают, но не ограничиваются ими, вектор адено-ассоциированного вируса (AAV), векторы лентивируса, векторы аденовируса, векторы, зависящего от аденовируса хелпера (HDAd), векторы вируса герпеса простого (HSV-1), бактериофаг T4, бакуловирусные векторы и ретровирусные векторы. В некоторых вариантах воплощения изобретения вирусный вектор может быть вектором AAV.

[182] В некоторых вариантах воплощения изобретения вирусным вектором являются AAV2, AAV3, AAV3B, AAV5, AAV6, AAV6.2, AAV7, AAVrh.64R1, AAVhu.37,

AAVrh.8, AAVrh.32.33, AAV8, AAV9, AAVrh10 или AAVLK03. В других вариантах воплощения вирусным вектором может быть вектор лентивируса.

[183] В некоторых вариантах воплощения изобретения лентивирус может не интегрироваться. В некоторых вариантах воплощения изобретения вирусный вектор может быть вектором аденовируса. В некоторых вариантах воплощения изобретения аденовирус может характеризоваться высоко клонирующей емкостью или может быть «выпотрошенным» аденовирусом, в котором, для повышения его способности к сворачиванию, удалены все кодирующие вирусные области кроме 5' и 3' инвертированных терминальных повторов (ITRs) и сигнала к свертыванию ('I'). В других вариантах воплощения изобретения вирусным вектором может быть вектор HSV-1. В некоторых вариантах воплощения изобретения вектор на основе HSV-1 является зависимым от хелпера, а в других вариантах воплощения он не зависит от хелпера. Например, вектор ампликона, который сохраняет только корпусную последовательность, требует вирус хелпер со структурными компонентами для упаковки, однако после удаления 30 т.п.н. вектора HSV-1 для устранения несвойственных вирусу функций, не требуется вирус хелпер. В дополнительных вариантах воплощения вирусный вектор может быть бактериофагом T4. В некоторых вариантах воплощения изобретения бактериофаг T4 со свободной головкой, может сворачивать любую линейную или кольцевую ДНК или молекулы РНК. В следующих вариантах воплощения вирусный вектор может быть бакуловирусным вектором. Для дальнейших вариантов воплощения вирусный вектор может быть вектором ретровируса. В вариантах воплощения с использованием AAV или лентивирусных векторов, которые характеризуются меньшей способностью клонирования, возможно, потребуется применение более одного вектора для доставки всех компонентов векторной системы, раскрытых в этом документе. Например, один вектор AAV может содержать последовательности, кодирующие РНК гид нуклеазы ДНК, такой как нуклеаза Cas, в то время как второй вектор AAV может содержать одну или более последовательностей гида.

[184] В некоторых вариантах воплощения изобретения вектор может управлять экспрессией одной или более кодирующих последовательностей в клетке. В некоторых вариантах воплощения изобретения клетка может быть прокариотической, например, бактериальная клетка. В некоторых вариантах воплощения изобретения клетка может быть эукариотической, например, клетки дрожжей, растений, насекомых или млекопитающих. В некоторых вариантах воплощения изобретения эукариотическая клетка может быть клеткой млекопитающих. В некоторых вариантах воплощения изобретения эукариотическая клетка может быть клеткой грызунов. В некоторых вариантах воплощения изобретения эукариотическая клетка может быть клеткой человека. На настоящее время известны соответствующие промоторы для генной инженерии, управляющие экспрессией в различных типах клеток. В некоторых вариантах воплощения изобретения промотор может быть «дикого» типа. В других вариантах воплощения промотор может быть модифицирован для более успешной или производительной экспрессии. В других

вариантах воплощения промотор может быть обрезан, но сохранять свою функцию. Например, промотор может быть нормального или уменьшенного размера, который подходит для надлежащей упаковки вектора в вирус.

[185] В некоторых вариантах воплощения изобретения вектор может включать последовательность нуклеотида, кодирующую РНК гид нуклеазы ДНК, такой как нуклеаза, представленная в настоящем документе. В некоторых вариантах воплощения изобретения нуклеаза, закодированная вектором, может быть белком Cas. В некоторых вариантах воплощения изобретения векторная система может включать одну копию последовательности нуклеотида, кодирующего нуклеазу. В других воплощениях векторная система может включать более чем одну копию последовательности нуклеотида, кодирующего нуклеазу. В некоторых вариантах воплощения изобретения последовательность нуклеотида, кодирующая нуклеазу, может быть функционально связанной по меньшей мере с одной транскрипционной или трансляционной контрольной последовательностью. В некоторых вариантах воплощения изобретения последовательность нуклеотида, кодирующая нуклеазу, может быть функционально связана по меньшей мере с одним промотором.

[186] В некоторых вариантах воплощения изобретения промотор может быть конститутивным, индуцибельным или тканеспецифическим. В некоторых вариантах воплощения изобретения промотор может быть конститутивным промотором. Иллюстративные примеры конститутивных промоторов включают, но не ограничиваются ими, промотор гена раннего ответа цитомегаловируса (CMV), промотор обезьяноподобного вируса (SV40); промотор позднего ответа аденовируса (MLP), промотор вируса саркомы Рауса (RSV); промотор вируса опухоли молочных желез мыши (MMTV), промотор фосфоглицерат киназы (PGK), промотор фактора элонгации альфа (EF1a); промоторы убиквитина, промоторы актина, промоторы тубулина, промоторы иммуноглобулина, их функциональный фрагмент или комбинации любого из предшествующих промоторов. В некоторых вариантах воплощения изобретения промотор может быть промотором CMV. В некоторых вариантах воплощения изобретения промотор может быть усеченным промотором CMV. В других вариантах воплощения промотор может быть промотором EF1a. В некоторых вариантах воплощения изобретения промотор может быть индуцибельным промотором. Иллюстративные примеры индуцибельных промоторов включают, но не ограничиваются ими, индуцибельные тепловым шоком, светом, химическими веществами, пептидами, металлами, стероидами, антибиотиками или спиртом. В некоторых вариантах воплощения изобретения индуцибельным промотором может быть промотор с низким базальным (не индуцированным) уровнем экспрессии, такой как, например, промотор Tet-On[®] (Clontech).

[187] В некоторых вариантах воплощения изобретения промотор может быть тканеспецифическим, например, промотором, который специфически экспрессируется в печени.

[188] Вектор может дополнительно включать последовательность нуклеотида,

кодирующую РНК гида, представленную в этом документе. В некоторых вариантах воплощения изобретения вектор включает одну копию РНК гида. В других вариантах воплощения вектор включает более чем одну копию РНК гида. В вариантах воплощения с более чем одной РНК гида, РНК гида могут быть неидентичными и предназначаться для различных таргетных последовательностей, или могут быть идентичными и ориентированы на одну таргетную последовательность. В некоторых вариантах воплощения, где векторы включают более чем одну РНК гида, каждая РНК гида может характеризоваться другими различными свойствами, такими как активность или стабильность в комплексе с РНК гидом нуклеазы ДНК, такого как Cas - RNP комплекс. В некоторых вариантах воплощения изобретения последовательность нуклеотида, кодирующая РНК гида, может быть функционально связана по меньшей мере с одной транскрипционной или трансляционной контрольной последовательностью, такой как промотор, 3' UTR или 5' UTR. В одном варианте воплощения промотором может быть промотор тРНК, *например*, tRNA^{Lys3}, или химерная тРНК. См. Mefferd et al., *RNA*. 2015 21:1683-9; Scherer et al., *Nucleic Acids Res.* 200735: 2620-2628. В некоторых вариантах воплощения изобретения промотором может быть полимеразы III РНК (Pol III). Примеры промоторов Pol III включают, но не ограничиваются ими, U6 и промоторы H1. В некоторых вариантах воплощения изобретения последовательность нуклеотида, кодирующая РНК гида, может быть функционально связана с промотором U6 человека или мыши. В других вариантах воплощения последовательность нуклеотида, кодирующая РНК гида, может быть функционально связана с промотором H1 человека или мыши. В вариантах воплощения с более чем одной РНК гида, промоторы, используемые для запуска экспрессии, могут быть одинаковыми или различными. В некоторых вариантах воплощения изобретения, нуклеотид, кодирующий РНК гид crRNA и нуклеотид, кодирующий РНК гид trRNA, могут быть предоставлены на том же самом векторе. В некоторых вариантах воплощения, нуклеотид, кодирующий crRNA и нуклеотид, кодирующий trRNA, могут активироваться одним и тем же промотором. В некоторых вариантах воплощения изобретения crRNA и trRNA могут быть транскрибированы в один транскрипт. Например, crRNA и trRNA могут быть процессированы из одного транскрипта для формирования РНК гида, состоящей из двух молекул. Альтернативно, crRNA и trRNA могут быть транскрибированы в одиночную молекулу РНК гид (sgRNA). В других вариантах воплощения crRNA и trRNA могут вводиться их соответствующими промоторами в один и тот же вектор. В других вариантах воплощения crRNA и trRNA могут кодироваться различными векторами.

[189] В некоторых вариантах воплощения изобретения последовательность нуклеотида, кодирующая РНК гида, может быть расположена на том же самом векторе, включающем последовательность нуклеотида, кодирующую РНК гид нуклеазы ДНК, такой как нуклеаза Cas. В некоторых вариантах воплощения изобретения экспрессию РНК гида и РНК гида нуклеазы ДНК, такой как белок Cas могут вводить их собственные соответствующие промоторы. В некоторых вариантах воплощения изобретения экспрессию РНК гида может вводить тот же самый промотор, который ведет экспрессию

РНК гида нуклеазы ДНК, такой как белок Cas.

[190] В некоторых вариантах воплощения изобретения РНК гид и РНК гид нуклеазы ДНК, такой как транскрипт белка Cas могут содержаться в структуре одного транскрипта. Например, РНК гид может быть в структуре нетранслируемого региона (UTR) РНК гида нуклеазы ДНК, такой как транскрипт белка Cas. В некоторых вариантах воплощения изобретения РНК гид может быть в структуре 5'UTR транскрипта. В других вариантах воплощения РНК гида может быть в структуре 3'UTR транскрипта. В некоторых вариантах воплощения изобретения период внутриклеточного полураспада транскрипта может быть снижен содержанием РНК гида в структуре ее 3' UTR и таким образом сокращая длину ее 3' UTR. В дополнительных вариантах воплощения РНК гида может быть в структуре интрона транскрипта. В некоторых вариантах воплощения изобретения соответствующие сайты сплайсинга могут быть добавлены в структуру интрона, в которой РНК гида расположена таким образом, что РНК гида надлежащим образом сращивается с транскриптом. В некоторых вариантах воплощения изобретения экспрессия РНК гида нуклеазы ДНК, такой как белок Cas и РНК гида от аналогичного вектора в непосредственной темпоральной близости может облегчить более эффективное формирование комплекса CRISPR RNP.

[191] В некоторых вариантах воплощения изобретения композиции включают векторную систему. В некоторых вариантах воплощения изобретения векторная система может включать только один вектор. В других вариантах воплощения векторная система может включать два вектора. В дополнительных вариантах воплощения векторная система может включать три вектора. При использовании для мультиплексирования различных РНК гида, или множественных копий РНК гида, векторная система может включать более трех векторов.

[192] В некоторых вариантах воплощения изобретения векторная система может включать индуцибельные промоторы для запуска экспрессии только после их доставки в целевую клетку. Иллюстративные примеры индуцибельных промоторов включают, но не ограничиваются ими, промоторы, индуцибельные тепловым шоком, светом, химическими веществами, пептидами, металлами, стероидами, антибиотиками или спиртом. В некоторых вариантах воплощения изобретения индуцибельный промотор может быть таким, который имеет низкий базальный (неиндуцированный) уровень экспрессии, таким как, например, промотор Tet-On[®] (Clontech).

[193] В дополнительных вариантах воплощения векторная система может включать тканеспецифические промоторы, обеспечивающие начало экспрессии только после их доставки в специфическую ткань.

[194] Вектор может быть доставлен в липосомах, наночастицах, экзосомах или микрочастицах. Вектор также может быть доставлен в липидных наночастицах (LNP); смотрите, например, патент U.S.S.№ 62/433228, поданный 12 декабря 2016 года под названием «LIPID NANOPARTICLE FORMULATIONS FOR CRISPR/CAS COMPONENTS», содержание которого полностью включено в данный документ

посредством ссылки. Любые из LNP и составов LNP, представленных в этом документе, являются уместными для доставки только проводников, или вместе с нуклеазой Cas, или с мРНК, кодирующей нуклеазу Cas. В некоторых вариантах воплощения изобретения заключена композиция LNP, которая включает: компонент РНК и компонент липида, отличающиеся тем, что липидный компонент включает аминоклипид, нейтральный липид, липид хелпер и липид «невидимку»; в которых соотношение N/P составляет приблизительно 1-10.

[195] В некоторых случаях, липидный компонент включает липид А или его ацетилированный аналог, холестерин, DSPC, и PEG-DMG; с соотношением N/P приблизительно 1-10. В некоторых вариантах воплощения изобретения липидный компонент включает: приблизительно 40-60 моль% аминоклипид; приблизительно 5-15 моль% нейтрального липида; и приблизительно 1,5-10 моль% липида PEG, с дополнением липидом хелпера до 100% содержания, при этом соотношение N/P в композиции LNP составляет приблизительно 3-10. В некоторых вариантах воплощения изобретения липидный компонент включает приблизительно 50-60 моль% аминоклипид; приблизительно 8-10 моль% нейтрального липида; и приблизительно 2,5-4 моль% липида PEG, с дополнением липидом хелпера до 100% содержания, при этом соотношение N/P в композиции LNP составляет приблизительно 3-8. В некоторых случаях, липидный компонент включает: приблизительно 50-60 моль% аминоклипид, приблизительно 5-15 моль% DSPC; и приблизительно 2,5-4 моль% липида PEG, с дополнением холестерином в качестве компонента липида до 100% содержания, при этом соотношение N/P композиции LNP составляет приблизительно 3-8. В некоторых случаях, липидный компонент включает: 48-53 моль% липида А; приблизительно 8-10 моль% DSPC; и 1,5-10 моль% липида PEG, с дополнением холестерином в качестве компонента липида до 100% содержания, при этом соотношение N/P в композиции LNP составляет приблизительно 3-8 ±0,2.

[196] В некоторых вариантах воплощения изобретения вектор можно доставить системно. В некоторых вариантах воплощения изобретения вектор может быть доставлен в кровотоки печени.

[197] Представленное изобретение и иллюстративные варианты его воплощения не должны восприниматься как ограничивающие. Для целей этого описания и прилагаемой формулы изобретения, если иначе не указано, все числовые значения, выражающие количества, проценты, или пропорции, и другие числовые значения, используемые в описании и пунктах формулы изобретения, должны восприниматься как изменяемые во всех случаях с термином «около» к величинам, модифицированным таким образом. Соответственно, если не указано обратное, числовые параметры, сформулированные в следующем описании и пунктах формулы изобретения, являются приближенными, могут также изменяться в зависимости от получения желательных свойств. По меньшей мере, это не является попыткой ограничить использование доктрины эквивалентов в прилагаемой формуле изобретения, каждый числовой параметр должен по меньшей мере рассматриваться в свете количества сообщаемых значимых цифр, с применением

традиционных методов округления.

[198] Следует отметить, что, при использовании в данном описании и прилагаемых пунктах формулы изобретения, формы единственного числа включают также обозначение форм во множественном числе, если она четко и недвусмысленно не ограничена формой в единственном числе. Используемый в представленном документе термин «включает» и его грамматические варианты предназначены, без ограничения, для перечисления перечня позиций, но не исключает синонимы, которыми можно заменить декларируемые положения.

ПРИМЕРЫ

[199] Для иллюстрации раскрытия некоторых пунктов воплощения изобретения предоставлены примеры, которые в любом случае не должны рассматриваться как ограничивающие.

Пример 1. Материалы и способы

Транскрипция в условиях in vitro («IVT») мРНК нуклеазы

[200] Кепированная и полиаденилированная мРНК *Cas9 Streptococcus pyogenes* («Spru») содержащая N1-метил псевдо-U, была получена транскрипцией в условиях *in vitro*, используя линейризованную матрицу ДНК плазмиды и РНК полимеразу T7. ДНК плазида, содержащая промотор T7, последовательность для транскрипции согласно SEQ ID №: 1 или 2, и 100 нуклеотидов поли-(A/T) домена подвергалась линейризации инкубацией при температуре 37°C в течение 2 часов с XbaI в следующих условиях: 200 нг/мкл плазмиды, 2 Е/мкл XbaI (NEB) и 1x реакционный буфер. XbaI инактивировался нагреванием реакционной смеси при 65°C в течение 20 мин. Линейризованная плазида подвергалась очистке от фермента и солей буфера, при использовании пластиковой колонки с силикагелем (Epoch Life Sciences) и проанализирована в агарозном геле для подтверждения линейризации. Реакция IVT для генерирования модифицированной мРНК Cas9 выполнена при температуре 37°C в течение 4 часов при следующих условиях: 50 нг/мкл линейризованной плазмиды; по 2 мМ каждого из ГТФ, АТФ, СТР и N1-метил псевдо-УТР (Trilink); 10 мМ ARCA (Trilink); 5 Е/мкл РНК полимеразы T7 (NEB); 1 Е/мкл мышинового ингибитора РНК-азы (NEB); 0,004 Е/мкл неорганической пирофосфатазы *E. coli* (NEB); и 1x реакционного буфера. После инкубации в течение 4 часов была добавлена TURBO DNase (Thermo Fisher) в конечной концентрации 0,01 Е/мкл, и реакционная смесь инкубировалась дополнительно в течение 30 минут для удаления матрицы ДНК. мРНК Cas9 очищалась от фермента и нуклеотидов, с использованием кита Mega Clear Transcription Clean-up согласно инструкции производителя (ThermoFisher). Альтернативно, мРНК очищалась по протоколу осаждения, который в некоторых случаях сопровождался очисткой методом ВЭЖХ. Кратко, после расщепления дезоксирибонуклеазой, мРНК преципитировалась добавлением 0,2 объема 7,5М раствора LiCl, после перемешивания, преципитированная мРНК осаждалась центрифугированием. После отделения супернатанта, мРНК ресуспендировалась в воде. мРНК повторно осаждалась, используя ацетат аммония и этанол. 5М ацетат аммония добавлялся к раствору мРНК в конечной

концентрации 2М вместе с 2х объемами 100% EtOH. Раствор смешивался и инкубировался при температуре минус 20°C, в течение 15 минут. Преципитированная мРНК повторно осаждалась центрифугированием, супернатант удалялся и мРНК ресуспендировалась в воде. На заключительном шаге, мРНК преципитировалась, используя ацетат натрия и этанол. 3М ацетат натрия (рН 5.5) был добавлен к раствору в соотношении 1/10, вместе с 2х объемами 100% EtOH. Раствор смешивался и инкубировался при температуре минус 20°C, в течение 15 минут. Преципитированная мРНК повторно осаждалась центрифугированием, осадок отмывался 70% охлажденным этанолом и высушивался на воздухе. мРНК ресуспендировалась в воде. Поскольку мРНК, после осаждения LiCl и восстановления очищалась методом ВЭЖХ, далее мРНК очищалась с помощью обратно-фазовой ВЭЖХ (RP-IP HPLC) (смотрите, например, Kariko et al. *Nucleic Acids Research*, 2011, Vol. 39, No. 21 e142). Отобранные фракции объединялись и обессоливались осаждением ацетатом натрия/этанолом, как описано выше. Концентрация транскрипта определялась спектрофотометрически, измеряя поглощение при длине волны 260 нм (Nanodrop), транскрипт анализировался капиллярным электрофорезом на установке Bioanalyzer (Agilent).

[198] Когда SEQ ID №s: 1 и 2 упоминаются ниже в отношении РНК, подразумевается, что Ts должен быть заменен на Us (которые были псевдоуридинами N1-метила как описано выше). мРНК Cas9, используемые в Примерах, включают 5' кэп и 3' поли-А-хвост, например, до 100 нуклеотидов и являются идентифицированными в SEQ ID №:.

[199] SEQ ID №: 1: последовательность Cas9 1 для транскрипции.

GGGTCCCGCAGTCGGCGTCCAGCGGCTCTGCTTGTTTCGTGTGTGTGTCGTTGC
 AGGCCTTATTCGGATCCGCCACCATGGACAAGAAGTACAGCATCGGACTGGACATC
 GGAACAAACAGCGTCGGATGGGCAGTCATCACAGACGAATACAAGGTCCCGAGCA
 AGAAGTTCAAGGTCCTGGGAAACACAGACAGACACAGCATCAAGAAGAACCTGATC
 GGAGCACTGCTGTTTCGACAGCGGAGAAACAGCAGAAGCAACAAGACTGAAGAGAA
 CAGCAAGAAGAAGATACACAAGAAGAAAGAACAGAATCTGCTACCTGCAGGAAAT
 CTTAGCAACGAAATGGCAAAGGTCGACGACAGCTTCTTCCACAGACTGGAAGAAA
 GCTTCCTGGTTCGAAGAAGACAAGAAGCACGAAAGACACCCGATCTTCGGAAACATC
 GTCGACGAAGTCGCATACCACGAAAAGTACCCGACAATCTACCACCTGAGAAAGAA
 GCTGGTCGACAGCACAGACAAGGCAGACCTGAGACTGATCTACCTGGCACTGGCAC
 ACATGATCAAGTTCAGAGGACACTTCCTGATCGAAGGAGACCTGAACCCGGACAAC
 AGCGACGTCGACAAGCTGTTTCATCCAGCTGGTCCAGACATACAACCAGCTGTTTGA
 AGAAAACCCGATCAACGCAAGCGGAGTCGACGCAAAGGCAATCCTGAGCGCAAGA
 CTGAGCAAGAGCAGAAGACTGGAAAACCTGATCGCACAGCTGCCGGGAGAAAAGA
 AGAACGGACTGTTTCGGAAACCTGATCGCACTGAGCCTGGGACTGACACCGAACTTC
 AAGAGCAACTTCGACCTGGCAGAAGACGCAAAGCTGCAGCTGAGCAAGGACACAT
 ACGACGACGACCTGGACAACCTGCTGGCACAGATCGGAGACCAGTACGCAGACCTG
 TTCCTGGCAGCAAAGAACCTGAGCGACGCAATCCTGCTGAGCGACATCCTGAGAGT

CAACACAGAAATCACAAAGGCACCGCTGAGCGCAAGCATGATCAAGAGATACGAC
GAACACCACCAGGACCTGACACTGCTGAAGGCACTGGTCAGACAGCAGCTGCCGGA
AAAGTACAAGGAAATCTTCTTCGACCAGAGCAAGAACGGATACGCAGGATACATCG
ACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAATTCTACAAGTTCATCAAGCCGATCCTGGAAAAG
ATGGACGGAACAGAAGAACTGCTGGTCAAGCTGAACAGAGAAGACCTGCTGAGAA
AGCAGAGAACATTCGACAACGGAAGCATCCCGCACCAGATCCACCTGGGAGAACTG
CACGCAATCCTGAGAAGACAGGAAGACTTCTACCCGTTCTGAAGGACAACAGAGA
AAAGATCGAAAAGATCCTGACATTCAGAATCCCGTACTACGTCGGACCGCTGGCAA
GAGGAAACAGCAGATTCGCATGGATGACAAGAAAGAGCGAAGAAACAATCACACC
GTGGAACTTCGAAGAAGTCGTCGACAAGGGAGCAAGCGCACAGAGCTTCATCGAAA
GAATGACAAACTTCGACAAGAACCTGCCGAACGAAAAGGTCCTGCCGAAGCACAGC
CTGCTGTACGAATACTTCACAGTCTACAACGAACTGACAAAGGTCAAGTACGTAC
AGAAGGAATGAGAAAGCCGGCATTCTGAGCGGAGAACAGAAGAAGGCAATCGTC
GACCTGCTGTTCAAGACAAACAGAAAGGTCACAGTCAAGCAGCTGAAGGAAGACTA
CTTCAAGAAGATCGAATGCTTCGACAGCGTCGAAATCAGCGGAGTCGAAGACAGAT
TCAACGCAAGCCTGGGAACATAACCACGACCTGCTGAAGATCATCAAGGACAAGGAC
TTCCTGGACAACGAAGAAAACGAAGACATCCTGGAAGACATCGTCCTGACACTGAC
ACTGTTCTGAAGACAGAGAAATGATCGAAGAAAGACTGAAGACATACGCACACCTGT
TCGACGACAAGGTCATGAAGCAGCTGAAGAGAAGAAGATACACAGGATGGGGAAG
ACTGAGCAGAAAGCTGATCAACGGAATCAGAGACAAGCAGAGCGGAAAGACAATC
CTGGACTTCTGAAGAGCGACGGATTCGCAAACAGAACTTCATGCAGCTGATCCA
CGACGACAGCCTGACATTCAAGGAAGACATCCAGAAGGCACAGGTCAGCGGACAG
GGAGACAGCCTGCACGAACACATCGCAAACCTGGCAGGAAGCCCGGCAATCAAGA
AGGGAATCCTGCAGACAGTCAAGGTCGTCGACGAACTGGTCAAGGTCATGGGAAGA
CACAAGCCGGAAAACATCGTCATCGAAATGGCAAGAGAAAACCAGACAACACAGA
AGGGACAGAAGAACAGCAGAGAAAGAATGAAGAGAATCGAAGAAGGAATCAAGG
AACTGGGAAGCCAGATCCTGAAGGAACACCCGGTCGAAAACACACAGCTGCAGAA
CGAAAAGCTGTACCTGTACTACCTGCAGAACGGAAGAGACATGTACGTTCGACCAGG
AACTGGACATCAACAGACTGAGCGACTACGACGTCGACCACATCGTCCCGCAGAGC
TTCCTGAAGGACGACAGCATCGACAACAAGGTCCTGACAAGAAGCGACAAGAACA
GAGGAAAGAGCGACAACGTCCCGAGCGAAGAAGTCGTCAAGAAGATGAAGAACTA
CTGGAGACAGCTGCTGAACGCAAAGCTGATCACACAGAGAAAGTTCGACAACCTGA
CAAAGGCAGAGAGAGGAGGACTGAGCGAACTGGACAAGGCAGGATTCATCAAGAG
ACAGCTGGTCGAAACAAGACAGATCACAAAGCACGTCGCACAGATCCTGGACAGCA
GAATGAACACAAAGTACGACGAAAACGACAAGCTGATCAGAGAAGTCAAGGTCAT
CACACTGAAGAGCAAGCTGGTCAGCGACTTCAGAAAGGACTTCCAGTTCTACAAGG
TCAGAGAAATCAACAACCTACCACCACGCACACGACGCATACCTGAACGCAGTCGTC
GGAACAGCACTGATCAAGAAGTACCCGAAGCTGGAAAGCGAATTCGTCTACGGAGA
CTACAAGGTCTACGACGTCAGAAAGATGATCGCAAAGAGCGAACAGGAAATCGGA
AAGGCAACAGCAAAGTACTTCTTCTACAGCAACATCATGAACTTCTTCAAGACAGA

AATCACACTGGCAAACGGAGAAATCAGAAAGAGACCGCTGATCGAAACAAACGGA
 GAAACAGGAGAAATCGTCTGGGACAAGGGAAGAGACTTCGCAACAGTCAGAAAGG
 TCCTGAGCATGCCGCAGGTCAACATCGTCAAGAAGACAGAAGTCCAGACAGGAGGA
 TTCAGCAAGGAAAGCATCCTGCCGAAGAGAAAACAGCGACAAGCTGATCGCAAGAA
 AGAAGGACTGGGACCCGAAGAAGTACGGAGGATTCGACAGCCCGACAGTCGCATA
 CAGCGTCCTGGTCGTCGCAAAGGTCGAAAAGGGAAAGAGCAAGAAGCTGAAGAGC
 GTCAAGGAACTGCTGGGAATCACAATCATGGAAAGAAGCAGCTTCGAAAAGAACCC
 GATCGACTTCCTGGAAGCAAAGGGATACAAGGAAGTCAAGAAGGACCTGATCATCA
 AGCTGCCGAAGTACAGCCTGTTGAACTGGAAAACGGAAGAAAGAGAATGCTGGCA
 AGCGCAGGAGAACTGCAGAAGGGAAACGAACTGGCACTGCCGAGCAAGTACGTCA
 ACTTCCTGTACCTGGCAAGCCACTACGAAAAGCTGAAGGGAAAGCCCGAAGACAAC
 GAACAGAAGCAGCTGTTGTCGAACAGCACAAGCACTACCTGGACGAAATCATCGA
 ACAGATCAGCGAATTCAGCAAGAGAGTCATCCTGGCAGACGCAAACCTGGACAAGG
 TCCTGAGCGCATACAACAAGCACAGAGACAAGCCGATCAGAGAACAGGCAGAAAA
 CATCATCCACCTGTTCACTGACAAACCTGGGAGCACCGGCAGCATTCAAGTACTT
 CGACACAACAATCGACAGAAAGAGATACACAAGCACAAAGGAAGTCCTGGACGCA
 AACTGATCCACCAGAGCATCACAGGACTGTACGAAACAAGAATCGACCTGAGCCA
 GCTGGGAGGAGACGGAGGAGGAAGCCCGAAGAAGAAGAGAAAGGTCTAGCTAGCC
 ATCACATTTAAAAGCATCTCAGCCTACCATGAGAATAAGAGAAAGAAAATGAAGAT
 CAATAGCTTATTCATCTCTTTTTCTTTTTCTGTTGGTGTAAGCCAACACCCTGTCTAA
 AAAACATAAATTTCTTTAATCATTTTGCCTCTTTTTCTCTGTGCTTCAATTAATAAAAA
 ATGGAAAGAACCTCGAG

[200] SEQ ID №: 2: последовательность Cas9 2 для транскрипции.

GGGTCCCGCAGTCGGCGTCCAGCGGCTCTGCTTGTTCGTGTGTGTGTCGTTGC
 AGGCCTTATTCGGATCCATGGATAAGAAGTACTCAATCGGGCTGGATATCGGAACT
 AATTCGTGGGTTGGGCAGTGATCACGGATGAATACAAAGTGCCGTCCAAGAAGTT
 CAAGGTCCTGGGGAACACCGATAGACACAGCATCAAGAAAAATCTCATCGGAGCCC
 TGCTGTTTGACTCCGGCGAAACCGCAGAAGCGACCCGGCTCAAACGTACCGCGAGG
 CGACGCTACACCCGGCGGAAGAATCGCATCTGCTATCTGCAAGAGATCTTTTCGAAC
 GAAATGGCAAAGGTCGACGACAGCTTCTTCCACCGCCTGGAAGAATCTTTCCTGGTG
 GAGGAGGACAAGAAGCATGAACGGCATCCTATCTTTGGAAACATCGTCGACGAAGT
 GGCGTACCACGAAAAGTACCCGACCATCTACCATCTGCGGAAGAAGTTGGTTGACT
 CAACTGACAAGGCCGACCTCAGATTGATCTACTTGGCCCTCGCCATATGATCAAAT
 TCCGCGGACACTTCCTGATCGAAGGCGATCTGAACCCTGATAACTCCGACGTGGATA
 AGCTTTTCATTCAACTGGTGCAGACCTACAACCAACTGTTGCAAGAAAACCCAATCA
 ATGCTAGCGGCGTCGATGCCAAGGCCATCCTGTCCGCCCGGCTGTCGAAGTCGCGGC
 GCCTCGAAAACCTGATCGCACAGCTGCCGGGAGAGAAAAAGAACGGACTTTTCGGC
 AACTTGATCGCTCTCTCACTGGGACTCACTCCCAATTTCAAGTCCAATTTTGACCTGG
 CCGAGGACGCGAAGCTGCAACTCTCAAAGGACACCTACGACGACGACTTGGACAAT
 TTGCTGGCACAATTTGGCGATCAGTACGCGGATCTGTTCTTGCCGCTAAGAACCTT

TCGGACGCAATCTTGCTGTCCGATATCCTGCGCGTGAACACCGAAATAACCAAAGC
GCCGCTTAGCGCCTCGATGATTAAGCGGTACGACGAGCATCACCAGGATCTCACGCT
GCTCAAAGCGCTCGTGAGACAGCAACTGCCTGAAAAGTACAAGGAGATCTTCTTCG
ACCAGTCCAAGAATGGGTACGCAGGGTACATCGATGGAGGCGCTAGCCAGGAAGA
GTTCTATAAGTTCATCAAGCCAATCCTGAAAAGATGGACGGAACCGAAGAAGTGC
TGGTCAAGCTGAACAGGGAGGATCTGCTCCGGAAACAGAGAACCTTTGACAACGGA
TCCATTCCCCACCAGATCCATCTGGGTGAGCTGCACGCCATCTTGCGGCGCCAGGAG
GACTTTTACCCATTCTCAAGGACAACCGGGAAAAGATCGAGAAAATTCTGACGTTT
CGCATCCCGTATTACGTGGGCCACTGGCGCGCGGCAATTCGCGCTTCGCGTGGATG
ACTAGAAAATCAGAGGAAACCATCACTCCTTGGAATTTTCGAGGAAGTTGTGGATAA
GGGAGCTTCGGCACAAAGCTTCATCGAACGAATGACCAACTTCGACAAGAATCTCC
CAAACGAGAAGGTGCTTCTAAGCACAGCCTCCTTTACGAATACTTCACTGTCTACA
ACGAACTGACTAAAGTGAAATACGTTACTGAAGGAATGAGGAAGCCGGCCTTTCTG
TCCGGAGAACAGAAGAAAGCAATTGTCGATCTGCTGTTCAAGACCAACCGCAAGGT
GACCGTCAAGCAGCTTAAAGAGGACTACTTCAAGAAGATCGAGTGTTCGACTCAG
TGGAATCAGCGGGGTGGAGGACAGATTCAACGCTTCGCTGGGAACCTATCATGAT
CTCCTGAAGATCATCAAGGACAAGGACTTCCTTGACAACGAGGAGAACGAGGACAT
CCTGGAAGATATCGTCCTGACCTTGACCCTTTTCGAGGATCGCGAGATGATCGAGGA
GAGGCTTAAGACCTACGCTCATCTCTTCGACGATAAGGTCATGAAACAACCTCAAGC
GCCGCCGGTACACTGGTTGGGGCCGCCTCTCCCGCAAGCTGATCAACGGTATTCGCG
ATAAACAGAGCGGTAATAACTATCCTGGATTTCTCAAATCGGATGGCTTCGCTAATC
GTAACCTCATGCAATTGATCCACGACGACAGCCTGACCTTTAAGGAGGACATCCAA
AAAGCACAAAGTGTCCGGACAGGGAGACTCACTCCATGAACACATCGCGAATCTGGC
CGGTTCCCGGCGATTAAGAAGGGAATTCTGCAAACCTGTGAAGGTGGTCGACGAGC
TGGTGAAGGTCATGGGACGGCACAAACCGGAGAATATCGTGATTGAAATGGCCCGA
GAAAACCAGACTACCCAGAAGGGCCAGAAAACTCCCGCGAAAGGATGAAGCGGA
TCGAAGAAGGAATCAAGGAGCTGGGCAGCCAGATCCTGAAAGAGCACCCGGTGGAA
AACACGCAGCTGCAGAACGAGAAGCTCTACCTGTACTATTTGCAAAATGGACGGG
ACATGTACGTGGACCAAGAGCTGGACATCAATCGGTTGTCTGATTACGACGTGGAC
CACATCGTTCCACAGTCCTTTCTGAAGGATGACTCGATCGATAACAAGGTGTTGACT
CGCAGCGACAAGAACAGAGGGAAGTCAGATAATGTGCCATCGGAGGAGGTCGTGA
AGAAGATGAAGAATTACTGGCGGCAGCTCCTGAATGCGAAGCTGATTACCCAGAGA
AAGTTTGACAATCTCACTAAAGCCGAGCGCGGCGGACTCTCAGAGCTGGATAAGGC
TGGATTCATCAAACGGCAGCTGGTCGAGACTCGGCAGATTACCAAGCACGTGGCGC
AGATCTTGACTCCCGCATGAACACTAAATACGACGAGAACGATAAGCTCATCCGG
GAAGTGAAGGTGATTACCCTGAAAAGCAAACCTTGTGTCCGACTTTCGGAAGGACTT
TCAGTTTTACAAAGTGAGAGAAATCAACAACCTACCATCACGCGCATGACGCATACC
TCAACGCTGTGGTCGGTACCGCCCTGATCAAAAAGTACCCTAAACTTGAATCGGAGT
TTGTGTACGGAGACTACAAGGTCTACGACGTGAGGAAGATGATAGCCAAGTCCGAA
CAGGAAATCGGGAAAGCAAACCTGCGAAATACTTCTTTTACTCAAACATCATGAACTTT

TTCAAGACTGAAATTACGCTGGCCAATGGAGAAATCAGGAAGAGGGCCACTGATCGA
 AACTAACGGAGAAACGGGCGAAATCGTGTGGGACAAGGGCAGGGACTTCGCAACT
 GTTCGCAAAGTGCTCTCTATGCCGCAAGTCAATATTGTGAAGAAAACCGAAGTGCA
 AACCGGCGGATTTTCAAAGGAATCGATCCTCCCAAAGAGAAATAGCGACAAGCTCA
 TTGCACGCAAGAAAGACTGGGACCCGAAGAAGTACGGAGGATTCGATTTCGCCGACT
 GTCGCATACTCCGTCTCTCGTGGTGGCCAAGGTGGAGAAGGGAAAGAGCAAAAAGCT
 CAAATCCGTCAAAGAGCTGCTGGGGATTACCATCATGGAACGATCCTCGTTTCGAGA
 AGAACCCGATTGATTTCTCTCGAGGCGAAGGGTTACAAGGAGGTGAAGAAGGATCTG
 ATCATCAAACCTCCCAAGTACTCACTGTTTCGAACTGGAAAATGGTCGGAAGCGCAT
 GCTGGCTTCGGCCGGAGAACTCCAAAAGGAAATGAGCTGGCCTTGCCTAGCAAGT
 ACGTCAACTTCTCTATCTTGCTTCGCACTACGAAAACTCAAAGGGTCCACCGGAAG
 ATAACGAACAGAAGCAGCTTTTCGTGGAGCAGCACAAAGCATTATCTGGATGAAATC
 ATCGAACAAATCTCCGAGTTTTCAAAGCGCGTGATCCTCGCCGACGCCAACCTCGAC
 AAAGTCCTGTCGGCCTACAATAAGCATAGAGATAAGCCGATCAGAGAACAGGCCGA
 GAACATTATCCACTTGTTACCCCTGACTAACCTGGGAGCCCCAGCCGCCTTCAAGTA
 CTTCGATACTACTATCGATCGCAAAGATACACGTCCACCAAGGAAGTTCTGGACGC
 GACCCTGATCCACCAAAGCATCACTGGACTCTACGAACTAGGATCGATCTGTTCGCA
 GCTGGGTGGCGATGGCGGTGGATCTCCGAAAAAGAAGAGAAAGGTGTAATGAGCTA
 GCCATCACATTTAAAAGCATCTCAGCCTACCATGAGAATAAGAGAAAAGAAAATGAA
 GATCAATAGCTTATTCATCTCTTTTTCTTTTTTCGTTGGTGTAAAGCCAACACCCTGTC
 TAAAAAACATAAATTTCTTTAATCATTTTGCCTCTTTTCTCTGTGCTTCAATTAATAA
 AAAATGGAAAGAACCTCGAG

Дизайн гида TTR человека и дизайн гида TTR человека, который гомологичен дизайну яванской макаки (synomolgus monkey)

[201] Первичный отбор гида выполнен компьютерным моделированием, с использованием эталонного генома человека (например, hg38) и определенных пользователем интересующих геномных доменов (например, экзонов, кодирующих белок TTR), для идентификации PAM в интересующих доменах. Для каждого идентифицированного PAM были выполнены анализы и сообщена статистика. Далее были отобраны и упорядочены молекулы gRNA на основании ряда критериев (например, содержание GC, предполагаемая таргетная активность и потенциальная нетаргетная активность).

В общей сложности были смоделированы 68 РНК гидов для TTR (ENSG00000118271) таргетирующих регионы для белка, кодирующего домены с экзонами 1, 2, 3 и 4. Из всех 68 гидов, 33 были на 100% гомологичны с таковыми яванской макаки («обезьяна»). Кроме того, для 10 гидов TTR человека, которые были не абсолютно гомологичны к таковым обезьяны, разрабатывались «суррогатные» гиды, которые параллельно моделировались на соответствие таргетной последовательности гида обезьяны. Такие «суррогатные» или «инструментальные» гиды могут использоваться для скрининга у обезьян, например, для приближения активности и функции к гомологичной

последовательности гена человека. Последовательности гена и соответствующие координаты генома представлены в Таблице 1. Все РНК гена разрабатывались как двухцепочечные РНК гена, а подгруппы последовательностей гена разрабатывались как модифицированная одноцепочечная РНК гена (Таблица 2). Согласование идентификатор гена двухцепочечной РНК гена (dgRNA) с ID модифицированной одноцепочечной РНК гена (sgRNA), количество несоответствий с геномом обезьяны, а также точно подобранные ID генома обезьяны представлены в Таблице 3. Когда dgRNA применялись в экспериментальных исследованиях отображенных в примерах, тогда использовался SEQ ID №: 270.

Доставка в условиях in vitro мРНК Cas9 и РНК гена

[202] *Линия клеток HEK293_Cas9*. Клеточная линия эмбриональных клеток почки аденокарциномы человека HEK293, которая конститутивно экспрессирует Spу Cas9 («HEK293_Cas9») культивировалась в питательной среде DMEM, дополненной 10% эмбриональной бычьей сывороткой и 500 мкг/мл G418. Клетки наносились на планшет в плотности 10 000 клеток/лунка в 96 -луночном планшете за 24 часа до трансфекции. Клетки трансфектировались Липофектамином RNAiMAX (Thermo Fisher, каталожный №. 13778150) согласно протоколу производителя. Клетки трансфектировались липоплекс, содержащим индивидуальные crRNA (25 нм), trRNA (25 нм), Липофектамин RNAiMAX (0,3 мкл/лунка) и Оптимем (OptiMem).

[203] *Линия клеток HUH7*. Клеточная линия гепатоцеллюлярной карциномы человека HUH7 из банка клеточных линий Японии (Japanese Collection of Research Bioresources Cell Bank, каталожный номер. JCRB0403), культивировалась в питательной среде DMEM, дополненной 10% эмбриональной бычьей сывороткой. Клетки наносились на планшет в плотности 15 000 клеток/лунка в 96 -луночном планшете за 20 часов до трансфекции. Клетки трансфектировались Липофектамином Messenger MAX (Thermo Fisher, каталожный номер: LMRNA003) согласно протоколу производителя. Клетки последовательно трансфектировались липоплекс, содержащим мРНК Spу Cas9 (100 нг), Messenger MAX (0,3 мкл/лунка) и OptiMem, сопровождаемым отдельно липоплекс, содержащим индивидуальные crRNA (25нм), меченую trRNA (25 нм), MessengerMAX (0,3 мкл/лунка) и OptiMem.

[204] *Линия клеток HepG2*. Клеточная линия гепатоцеллюлярной карциномы человека HepG2 (Банк культур клеточных линий, США, каталожный номер HB 8065), культивировалась в питательной среде DMEM, дополненной 10% эмбриональной бычьей сывороткой. Клетки подсчитывались и высевались на 96-луночный планшет, покрытый Био-коллагеном I (ThermoFisher, каталожный номер 877272) плотностью 10 000 клеток/лунка за 24 часа до трансфекции. Клетки трансфектировались Липофектамином 2000 (ThermoFisher, каталожный номер. 11668019), согласно протоколу производителя. Затем клетки последовательно трансфицировались липоплексом, содержащим мРНК Spу Cas9 (100 нг), Липофектамином 2000 (0,2 мкл/лунка) и OptiMem, с последующим отделением липоплекса, содержащего индивидуальную crRNA (25 нм), меченую РНК (25

нм), Липофектамин 2000 (0,2 мкл/лунка) и OptiMem.

[205] *Первичные гепатоциты печени*. Первичные гепатоциты печени (PHH) человеческие и первичные гепатоциты печени обезьяны (PCH) (Gibco) культивировались согласно протоколу производителя (Invitrogen, протокол 11.28.2012). Вкратце, клетки оттаивали и ресуспендировали в среде оттаивания гепатоцитов с добавками (Gibco, каталожный номер CM7000) с последующим центрифугированием при 100g в течение 10 минут для гепатоцитов человека и при 80g в течение 4 минут для гепатоцитов обезьяны. После удаления супернатанта, осадок клеток ресуспендировали в среде культивирования гепатоцитов, с поставляемыми добавками (Invitrogen, каталожные №: A1217601 и CM3000). Клетки подсчитывались и высевались на 96-луночные планшеты, покрытые био-коллагеном I (ThermoFisher, каталожный номер 877272) в плотности 33 000 клеток/лунка для человеческих гепатоцитов или 60 000 клеток/лунка для гепатоцитов обезьяны (или 65 000 клеток/лунка для оценки влияния на белок TTR, представленный далее). Нанесенные на планшет клетки культивировали для распластывания и сцепления в течение 6 или 24 часов в инкубаторе для культуры тканей при 37°C и в 5% атмосфере CO₂. После формирования инкубированными клетками монослоя, среда инкубации заменялась на безсывороточную питательную среду с добавками для культивирования гепатоцитов (Invitrogen, каталожные номера: A1217601 и CM4000).

[206] Трансфекции на основе липофектамина RNAiMax (ThermoFisher, каталожный номер: 13778150) проводились согласно протоколу производителя. Клетки последовательно трансфицировались липоплексом, содержащим мРНК Spy Cas9 (100 нг), липофектамином RNAiMax (0,4 мкл/лунка) и OptiMem, с последующим отделением липоплекса, содержащего crRNA (25 нм) и меченую РНК (25 нм) или sgRNA (25 нм), Липофектамин RNAiMax (0,4 мкл/лунка) и OptiMem.

[207] Формирование рибонуклеотида в клетках выполнялось до электропорации или трансфекции белка Spy Cas9, нагруженных РНК гида (RNP). Для гида двухцепочечных РНК (dgRNA), отдельно предварительно отжигались crRNA и trRNA, смешивая эквивалентное количество реактива и производя инкубацию при температуре 95°C в течение 2 минут и охлаждались до комнатной температуры. Гиды одноцепочечной РНК (sgRNA) кипятили при температуре 95°C в течение 2 минут и охлаждали до комнатной температуры. Кипяченые dgRNA или sgRNA инкубировались с белком Spy Cas9 в OptiMem в течение 10 минут при комнатной температуре для формирования рибонуклеопротеинового (RNP) комплекса.

[208] Для электропорации RNP в первичные гепатоциты человека и гепатоциты обезьяны, клетки оттаивали и ресуспендировали в буфере для электропорации Lonza Primary Cell P3 в концентрации 2500 клеток на пиколитр для человеческих гепатоцитов и 3500 клеток на пиколитр для гепатоцитов обезьяны. Объем 20 мкл ресуспендированных клеток и 5 мкл RNP смешивали вместе для одного гида. 20 мкл смеси помещали в устройство для электропорации Lonza. Клетки электропорировали с использованием нуклефектора Lonza, по утвержденному протоколу EX-147. После электропорации клетки

переносили на чашки Biosoat, содержащие предварительно нагретую поддерживающую среду и помещали в инкубатор для культуры тканей при 37°C и 5% CO₂.

[209] Для трансфекции RNP липоплекс клетки трансфицировались Липофектаминол RNAiMAX (ThermoFisher, каталожный номер 13778150) согласно протоколу производителя. Трансфицировались клетки с RNP, содержащим Spy Cas9 (10 нМ), индивидуальный гид (10 нМ), меченую РНК (10 нМ), липофектамин RNAiMAX (1,0 мкл/лунка) и OptiMem. Формирование RNP было выполнено, как представлено ранее.

[210] LNP формировались либо микрофлюидным смешиванием липида и растворов РНК, используя устройство для прецизионных наносистем NanoAssemblr™ Benchtop, согласно протоколу производителя, или смешиванием в перекрестном потоке.

[211] Состав LNP - наноассемблер

[212] В общем, липидные компоненты наночастиц растворялись в 100% этаноле с липидным компонентом в различных молярных соотношениях. Нагруженная РНК растворялась в 25 мМ цитрате, 100мМ NaCl, pH 5,0, с конечной концентрацией нагруженной РНК приблизительно 0,45 мг/мл. LNP формировались в молярном соотношении аминоклипида к фосфату РНК (N:P) приблизительно 4,5 или приблизительно 6, с соотношением мРНК к gRNA 1:1 по весу.

[213] LNP формировались микрофлюидным смешиванием липида и растворов РНК, используя устройство для прецизионных наносистем NanoAssemblr™ Benchtop, согласно протоколу производителя. Во время смешивания выдерживалось соотношение 2:1 водных растворов к органическому растворителю, используя различие в скоростях потока. После смешивания LNP собирались и разбавлялись водой (около 1:1 объем/объем), выдерживались в течение 1 часа при комнатной температуре и далее разбавлялись водой (около 1:1 объем/объем) перед заключительной заменой на буфер. Буфер для заключительной замены включал: 50 мМ Трис, 45 мМ NaCl, 5% (вес/объем) сахарозу, pH=7,5 (TSS) с последующим обессоливанием на колонках PD-10 (GE). При необходимости, составы концентрировали центрифугированием на фильтрах Amicon 100 kDa (Millipore). Заключительная смесь фильтровалась, с использованием стерильного фильтра размером пор 0,2 мкм. Готовые LNP хранились при минус 80°C до дальнейшего использования.

Состав LNP - перекрестный поток

[214] Для LNP, полученных по методике перекрестного потока, они формировались смешиванием падающей струей раствора липида в этаноле с двумя объемами растворов РНК и одним объемом воды. Липид в этаноле смешивался перекрестно с двумя объемами раствора РНК. Четвертая подача воды смешивалась перекрестно с выходящим потоком через подключенный тройник. (Смотрите, ФИГ. 2 WO2016010840). LNP формировались в течение 1 часа при комнатной температуре, затем их разбавляли водой (около 1:1 объем/объем). Разбавленные LNP концентрировали с помощью тангенциальной проточной фильтрации на плоском листовом картридже (Sartorius, 100 kD MWCO), а затем подвергали диафильтрации в буфере, содержащем 50 мМ Трис, 45 мМ NaCl, 5% (вес/объем) сахарозу,

pH=7,5 (TSS). Альтернативно, буфер для заключительной замены TSS подвергался обессоливанию на колонках PD-10 (GE). При необходимости, составы концентрировали центрифугированием на центрифугирующих фильтрах Amicon 100 kDa (Millipore). Заключительная смесь затем фильтровалась, с использованием стерильного фильтра с размером пор 0.2 мкм. Готовые LNP хранились при 4° С или минус 80°С до дальнейшего использования.

Количественное определение состава

[215] Метод динамического рассеивания света («DLS»), может использоваться для характеристики коэффициента полидисперсности («*pdi*») и размера LNP в представленном раскрытии изобретения. Методом DLS измеряется рассеивание света образцом, помещенным в источник света. Показатель PDI определяется из результатов DLS и представляет распределение частиц по размеру (относительно среднего размера частиц) в смеси, по сравнению с однородным контролем, с PDI равным 0. Средний размер частиц и полидисперсность измерены методом динамического рассеивания света на установке (DLS) Malvern Zetasizer DLS. Образцы LNP разбавлялись в 30X в PBS перед измерением методом DLS. Сообщался Z-средний диаметр, который является производной от интенсивности, полученной на основании измерения среднего размера частиц и *pdi*. Прибор Malvern Zetasizer также используется для измерения дзета-потенциала LNP. Образцы перед измерением разбавлялись 1:17 (50мкл в 800мкл) в 0,1X PBS, pH= 7,4.

[216] Количественный анализ на основании флюоресценции на приборе (Ribogreen[®], ThermoFisher Scientific) использовался для определения общей концентрации РНК и свободной РНК. Эффективность включения рассчитывалась как (содержание общей РНК - содержание свободной РНК) / содержание общей РНК. Образцы LNP разбавлялись соответственно 1x TE буфером, содержащим 0,2% Тритон X-100 для определения содержания общей РНК или 1x TE буфером для определения содержания свободной РНК. Калибровочные кривые приготовлены с использованием маточного раствора РНК, который разводили в 1x TE буфере +/- 0,2%Тритон-X100. Затем разведенный краситель RiboGreen[®] добавлялся к каждому образцу стандартов и к исследуемым образцам согласно инструкции производителя. Образцы инкубировали в течение приблизительно 10 минут при комнатной температуре, в защищенном от света месте. Использовался ридер для чтения микропланшет Spectra Max M5 (Molecular Devices) при длинах волн возбуждения, автоматического спрямления и эмиссии: 488 нм, 515 нм и 525 нм, соответственно. Содержание общей и свободной РНК определено из калибровочных кривых соответствующих стандартов.

[217] Эффективность включения рассчитывалась как (содержание общей РНК - содержание свободной РНК) / содержание общей РНК. Аналогичная процедура может использоваться для определения эффективности включения компонентов нагрузки в ДНК. Для однострессовой ДНК может использоваться краситель Oligreen и для двухстрессовой ДНК краситель Picogreen.

[218] Как правило, при подготовке LNP, показатель включения был более 80%, размер частиц был менее 120 нм и *pdi* был менее 0,2.

Доставка LNP в условиях in vivo

[219] Если не указано иначе, в каждом исследовании использовались мыши-самки линии CD 1, возрастом 6-10 недель. Животных взвешивали и разделяли на группы согласно массе тела для подготовки растворов дозирования, согласно средней массе животных в группе. LNP вводили через боковую хвостовую вену в объеме 0,2 мл на животное (около 10 мл на килограмм массы тела). Экспериментальные животные наблюдались через приблизительно 6 часов после введения дозы для регистрации отрицательных воздействий. Измерялась масса тела через двадцать четыре часа после введения и животные подвергались эвтаназии в различные временные точки путем обескровливания кардиальной пункцией под анестезией изофлуораном. Кровь собирали в пробирки для получения сыворотки или в пробирки, содержащие забуференный раствор цитрата натрия, для плазмы, как описано в данном документе. Для исследований, вовлекающих редактирование в условиях *in vivo*, забирали среднюю долю ткани печени от каждого животного, или из трех отдельных долей (например, правая средняя, левая средняя и левая латеральная доли) для экстракции и анализа ДНК.

Анализ транстиретина (TTR), используемого в испытаниях на животных, методом ELISA

[220] Из собранных образцов крови получали сыворотку. Общий уровень сывороточного TTR мышей определяли, используя преальбумин мыши (транстиретин) из набора для метода ELISA (Aviva Systems Biology, каталожный номер OKIA00111); уровни TTR в сыворотке крыс измеряли, используя специальный кит ELISA для крыс (Aviva Systems Biology, каталожный номер OKIA00159); уровни TTR в сыворотке человека измеряли, используя специальный кит ELISA для человека (Aviva Systems Biology, каталожный номер OKIA00081); каждый согласно протоколу производителя. Вкратце, образцы сыворотки последовательно разбавляли раствором для разведения из набора до конечного 10 000 или 5000-кратного разведения, при измерении человеческого TTR в сыворотке мыши. На планшет, для исследования методом ELISA, наносили 100 мкл подготовленных образцов стандарта или разбавленных образцов сыворотки и инкубировали в течение 30 минут при комнатной температуре, затем планшет трижды промывали буфером для промывки. Затем наносили 100 мкл детектируемых антител к каждому образцу и инкубировали в течение 20 минут при комнатной температуре, с последующей трехкратной отмывкой. Далее добавляли 100 мкл субстрата и инкубировали в течение 10 минут при комнатной температуре перед внесением 100 мкл стоп раствора. Содержание измеряли по спектру поглощения на ридере для чтения планшет Spectramax M5, для анализа, использовали программное обеспечение версии 7.0 SoftmaxPro. Количественно уровни TTR определялись по калибровочной кривой стандарта, используя четырех параметрическую модель подгонки и выражались как мкг/мл сыворотки или в процентах снижения (лекарственного растворителя) относительно контроля животных.

Выделение геномной ДНК

[221] Трансфицированные клетки отбирали через 24, 48 или 72 часа после

трансфекции. Геномную ДНК экстрагировали из каждой лунки 96 - луночного планшета, используя 50 мкл/лунка раствора для экстрагирования ДНК Vucsal Amp (Epicentre, каталожный номер QE09050) согласно протоколу производителя. Для всех образцов ДНК выполнялся анализ ПЦР с последующей оценкой NGS, как представлено в этом документе.

Секвенирование следующего поколения (анализ «NGS»)

[222] Для количественного определения эффективности редактирования в таргетном положении генома использовали секвенирование для идентификации наличия инсерций и делеций, учитываемых при редактировании генов.

[223] Праймеры конструировались относительно таргетного сайта в структуре представляющего интерес гена (например, *TTR*), и интересующий геномный участок амплифицировался.

[224] Дополнительно к химическому секвенированию выполнялась ПЦР согласно протоколам производителя (Illumina). Ампликоны секвенировали на устройстве Illumina MiSeq. Считывание выполнено относительно референтного генома (например, референтный геном человека (hg38), референтный геном обезьяны (mf5), референтный геном крысы (rn6), или референтный геном мыши (mm 10)) после элиминации тех последовательностей, которые имеют низкие качественные показатели. Результирующие считанные файлы были картированы относительно референтного генома (BAM файлы), считанные перекрывающиеся таргетные домены, представляющие интерес, отбирались, и рассчитывалось количество последовательностей «дикого» типа против считанного количества, которые содержат инсерцию, мутацию или делецию.

[225] Определялся процент редактирования (например, «эффективность редактирования», или «процент редактирование» или «частота инсерций/делеций») как общее количество считанных последовательностей с делециями/инсерциями или мутациями из общего количества последовательностей, включая «дикий» тип.

Анализ секретируемого белка транстретина («TTR») методом Вестерн-блоттинга

[226] Уровни секретируемого белка TTR в среде определялись методом Вестерн-блоттинга. Клетки HepG2 трансфектировались как представлено ранее с выбранными генами из Таблицы 1. Замена среды проводилась каждые 3 дня после трансфекции. Через шесть дней после трансфекции среда удалялась, а клетки отмывались один раз средой, которая не содержала эмбриональную бычью сыворотку (FBS). Среда без сыворотки добавлялась к клеткам и клетки инкубировались при температуре 37°C. Через 4 часа среда удалялась и центрифугировалась для осаждения дебриса; оценивалось количество клеток в каждой лунке на основании значений, полученных из определения СТГ в оставшихся клетках, и сравнивались со средним количеством на планшете. После центрифугирования среда переносилась на новый планшет и хранилась при температуре минус 20°C. Затем к среде добавлялся ацетон для осаждения любого белка, секретируемого в среду. Четыре объема очень холодного ацетона добавлялись к одному объему среды. Раствор тщательно перемешивался и хранился при минус 20°C в течение 90 минут. Смесь ацетон : среда

центрифугировалась при 15 000xg и 4°C в течение 15 мин. После отделения супернатанта осадок высушивали на воздухе для удаления остаточного ацетона. Осадок повторно ресуспендировали в буфере 15 мкл RIPA (Boston Bio Products, каталожный номер: BP-115) плюс добавлялась свежеприготовленная смесь, состоящая из полного набора ингибиторов протеаз (Sigma, каталожный номер: 11697498001) и 1 мм дитиотреитола (DTT). Лизаты смешивали с буфером Лэмли (Laemmli) и денатурировали при 95°C в течение 10 минут. Вестерн-блоттинг проводился в системе NuPage на 12% бис-Трис геле (ThermoFisher) согласно протоколу производителя с последующим влажным переносом на нитроцеллюлозную мембрану с размером пор 0,45 мкм (Bio-Rad, каталожный номер: 1620115). Блоты фиксировали, используя 5% сухое молоко в TBS в течение 30 минут на лабораторном рокере при комнатной температуре. Блоты промывали TBST и зондировали кроличьими моноклональными антителами α -TTR (Abcam, каталожный номер: Ab75815) в концентрации 1:1000 в TBST. Альфа-1 антитрипсин наносился в качестве контроля для нанесения (Sigma, каталожный номер: HPA001292) в концентрации 1:1000 в TBST и инкубировался одновременно с первичными антителами к TTR. Блоты помещали в пакет и оставляли на ночь при температуре 4°C на рокере лаборатории. После инкубации блоты трижды промывали TBST в течение пяти минут каждый, и зондировали со вторичными кроличьими антителами (ThermoFisher, каталожный номер: PISA535571) в концентрации 1:25 000 в TBST в течение 30 минут при комнатной температуре. После инкубации блоты трижды промывали TBST, каждый в течение 5 минут, и 2 раза PBS. Блоты визуализировали и анализировали с использованием системы Licor Odyssey.

Анализ внутриклеточного TTR методом Вестерн-блоттинга

[227] Линия клеток гепатоцеллюлярной карциномы HUH7 трансфицировалась как ранее описано с выбранными гидами из Таблицы 1. Через шесть дней после трансфекции среда удалялась и клетки лизировались RIPA буфером 50 мкл/лунка (Boston Bio Products, каталожный номер: BP-115) с добавлением заново смеси ингибиторов протеазы, состоящей из полного коктейля ингибиторов протеазы (Sigma, каталожный номер: 11697498001), 1мМ DTT и 250Е/мл бензоазы (EMD Millipore, каталожный номер: 71206-3). Клетки выдерживали на льду в течение 30 минут, в это время добавлялся раствор NaCl (в конечной концентрации до 1М.). Лизаты клеток тщательно перемешивали и выдерживали на льду в течение 30 минут. Цельные экстракты клеток («WCE») переносили на планшет для ПЦР и центрифугировали для освобождения от дебриса. Содержание белка в лизатах определяли по методу Бредфорда (Bio-Rad, каталожный номер: 500-0001) согласно протоколу производителя. Экстракты до использования хранили при температуре минус 20°C. Для оценки содержания внутриклеточного белка TTR выполнялся анализ методом Вестерн-блоттинга. Лизаты смешивали с буфером Лэмли (Laemmli) и денатурировали при 95°C в течение 10 минут. Вестерн-блоттинг проводился в системе NuPage на 12% бис-Трис геле (ThermoFisher) согласно протоколу производителя с последующим влажным переносом на нитроцеллюлозную мембрану с размером пор 0,45 мкм (Bio-Rad, каталожный номер: 1620115). После переноса мембраны тщательно промывали водой и окрашивали раствором

Ponceau S (Boston Bio Products, каталожный номер: ST-180) с целью подтверждения полноты и равномерности переноса. Блоты фиксировали, используя 5% сухое молоко в TBS в течение 30 минут на лабораторном рокере при комнатной температуре. Блоты промывали TBST и зондировали кроличьими моноклональными антителами α -TTR (Abcam, каталожный номер: Ab75815) в концентрации 1:1000 в TBST. β -актин использовался в качестве контроля для нанесения (ThermoFisher, каталожный номер: AM4302) в концентрации 1:2500 в TBST и инкубировался одновременно с первичными антителами к TTR. Блоты помещали в пакет и оставляли на ночь при температуре 4°C на рокере лаборатории. После инкубации блоты трижды промывали TBST, в течение пяти минут каждый, и зондировали со вторичными кроличьими и мышинными антителами (ThermoFisher, каталожный номер: PI35518 и PISA535571) в концентрации 1:25 000 каждый в TBST в течение 30 минут при комнатной температуре. После инкубации блоты трижды промывали TBST, каждый в течение 5 минут, и 2 раза PBS. Блоты визуализировали и анализировали с использованием системы Licor Odyssey.

Пример 2. Скрининг последовательностей dgRNA

[228] *Перекрестный скрининг dgRNA TTR во множественных типах клеток*

[229] Совпадающие последовательности гидов dgRNA, таргетных к *TTR* человека и обезьяны, доставлялись в клетки HEK293_Cas9, HUH7, линии клеток HepG2, к первичным гепатоцитам человека и первичным гепатоцитам обезьяны как представлено в Примере 1. Процент редактирования определялся для sgRNA, включая каждую последовательность гида для каждого типа клеток, а затем последовательности гида нормировались относительно самого высокого процента редактирования. Результаты скрининга последовательностей гида Таблицы 1 на всех пяти линиях клеток представлены далее в Таблицах 4-11.

В Таблице 4 представлены показатели в процентах средних значений и стандартных отклонений редактирования, инсерций (Ins) и делеций (Del) в *TTR* sgRNA на линии клеток аденокарциномы почки человека HEK293 Cas9, которая постоянно сверхэкспрессирует белок Spу Cas9.

[230] **Таблица 4: редактируемые данные TTR в Нек Cas9 клетках, трансфицируемых с белком dgRNAs**

<i>Идент-р ГИДА</i>	<i>Среднее значение редактир ования, в %</i>	<i>Станд. откл. редактир ования, в %</i>	<i>Среднее количес тво инсерций, в в %</i>	<i>Станд. откл. количес тва инсерций, в %</i>	<i>Среднее к- во делеций, в %</i>	<i>Станд. откл. количес тва делеций, в %</i>
CR003335	26.59	4.73	4.73	0.65	21.87	4.09
CR003336	29.09	4.57	3.31	0.24	25.78	4.32
CR003337	42.72	1.72	5.24	1.62	37.48	0.70

CR003338	52.42	3.28	4.76	0.03	47.66	3.30
CR003339	56.37	4.13	49.39	3.23	6.98	0.91
CR003340	42.38	8.43	27.88	4.31	14.50	4.13
CR003341	20.04	5.26	6.73	1.86	13.31	3.41
CR003342	36.57	5.80	1.19	0.22	35.38	5.59
CR003343	24.36	1.51	4.82	0.43	19.53	1.39
CR003344	33.87	2.93	4.32	0.58	29.54	2.37
CR003345	35.02	7.05	19.00	3.58	16.01	3.48
CR003346	48.33	5.81	33.03	3.12	15.30	2.72
CR003347	21.45	5.57	0.95	0.33	20.50	5.26
CR003348	35.53	5.81	22.32	3.79	13.21	2.03
CR003349	13.19	4.46	8.03	2.81	5.16	1.66
CR003350	22.31	4.25	5.54	0.74	16.77	3.51
CR003351	49.67	3.77	28.42	1.69	21.24	2.22
CR003352	27.90	7.55	4.91	1.35	22.99	6.26
CR003353	25.03	5.16	3.71	0.75	21.32	4.42
CR003354	18.46	2.02	2.56	0.21	15.90	1.89
CR003355	30.60	2.53	6.99	0.80	23.61	1.75
CR003356	32.21	4.71	10.03	1.39	22.19	3.36
CR003357	43.23	6.71	5.38	0.87	37.85	5.88
CR003358	5.44	0.86	1.29	0.16	4.14	0.84
CR003359	37.75	7.50	18.35	3.73	19.40	3.78
CR003360	22.68	3.16	2.70	0.56	19.98	2.60
CR003361	34.45	8.97	8.66	1.66	25.78	7.32
CR003362	9.90	2.66	1.48	0.33	8.41	2.33
CR003363	31.03	10.74	14.77	4.21	16.26	6.54
CR003364	35.65	7.90	19.17	4.24	16.48	3.76
CR003365	36.43	6.20	11.83	1.88	24.61	4.45
CR003366	47.36	6.59	10.10	1.28	37.26	5.32
CR003367	47.11	15.43	28.44	9.11	18.67	6.33
CR003368	40.35	10.13	3.73	0.96	36.61	9.17
CR003369	33.10	7.26	9.06	1.12	24.04	6.16
CR003370	34.22	5.69	4.49	0.67	29.73	5.06
CR003371	25.60	8.33	3.84	1.41	21.76	6.92

CR003372	15.24	7.92	3.25	1.61	11.99	6.31
CR003373	13.55	2.40	1.31	0.21	12.25	2.19
CR003374	10.91	0.88	0.81	0.10	10.10	0.81
CR003375	11.63	3.18	0.78	0.17	10.85	3.05
CR003376	28.16	4.49	1.35	0.18	26.81	4.52
CR003377	24.70	4.44	2.71	0.54	21.99	3.91
CR003378	20.97	2.67	4.49	0.49	16.48	2.18
CR003379	26.32	2.91	5.34	0.61	20.98	2.30
CR003380	47.64	5.74	3.64	0.24	44.00	5.52
CR003381	22.04	5.74	3.82	1.26	18.23	4.64
CR003382	29.95	3.13	4.46	0.45	25.49	2.73
CR003383	40.47	0.64	25.12	0.45	15.35	0.66
CR003384	17.45	1.32	1.45	0.23	16.00	1.42
CR003385	26.19	5.62	7.36	1.57	18.82	4.06
CR003386	33.12	10.65	2.94	0.63	30.18	10.03
CR003387	24.68	5.93	7.75	1.99	16.92	3.94
CR003388	19.23	4.41	1.41	0.39	17.82	4.07
CR003389	34.18	5.09	10.30	2.12	23.87	3.02
CR003390	28.02	3.77	4.31	0.25	23.71	3.61
CR003391	44.81	4.67	0.61	0.07	44.19	4.63
CR003392	21.67	7.52	0.85	0.26	20.82	7.27

[231] В Таблице 5 представлены показатели в процентах средних значений и стандартных отклонений для редактирования, инсерций (Ins) и делеций (Del) в тестируемых crRNA TTR, которые совместно трансфицированы с мРНК Spv Cas9 (SEQ ID NO:2) в клеточной линии гепатоцеллюлярной карциномы человека HUH7.

Таблица 5: Результаты редактирования TTR в клетках HUH7, трансфицированных мРНК Spv Cas9 и dgRNA

Идент-р гида	Среднее значение редактир ования, в %	Стандарт. отклон. для редактир ования, в %	Среднее к-во инсерций, в % I	Станд. отклонен ие инсерций в %	Среднее количест во делеций, в%	Станд. отклонен ие делеций, в %
CR003335	31.95	4.50	4.62	0.83	27.57	4.08
CR003336	30.05	4.25	4.14	1.07	26.56	3.55

CR003337	55.72	3.12	8.34	0.93	48.95	2.24
CR003338	75.64	2.03	10.22	1.42	67.06	2.79
CR003339	79.97	4.73	60.55	3.94	20.13	1.02
CR003340	46.93	7.12	33.33	6.01	14.23	1.65
CR003341	20.58	5.98	7.78	1.64	13.20	4.44
CR003342	45.14	7.16	1.23	0.91	44.66	7.68
CR003343	76.13	7.04	9.58	3.49	66.97	6.10
CR003344	64.02	3.33	10.76	1.35	54.40	2.71
CR003345	72.43	2.17	41.33	0.96	32.18	1.37
CR003346	18.07	1.02	13.17	1.39	6.97	3.06
CR003347	32.16	5.50	1.64	0.42	30.79	5.11
CR003348	57.14	10.98	36.08	6.97	22.71	4.42
CR003349	14.14	4.99	9.73	3.26	4.82	1.91
CR003350	52.91	7.61	13.43	2.00	41.64	6.03
CR003351	63.51	4.61	36.87	2.49	27.49	2.14
CR003352	39.68	9.53	7.62	7.42	32.79	7.37
CR003353	69.18	4.59	7.73	2.46	62.87	3.13
CR003354	12.27	3.38	1.25	0.40	11.46	3.23
CR003355	38.83	5.31	9.40	1.81	30.31	3.56
CR003356	49.63	5.55	18.98	2.67	31.31	3.04
CR003357	36.31	5.72	6.37	1.17	30.82	4.68
CR003358	36.50	6.17	10.53	1.56	26.60	4.49
CR003359	66.75	5.84	21.73	2.30	45.97	3.93
CR003360	58.62	8.73	5.01	0.60	55.13	8.19
CR003361	28.68	6.52	6.84	1.26	22.44	5.31
CR003362	26.43	0.83	3.43	0.32	23.76	0.85
CR003363	41.01	7.16	17.83	3.32	23.78	3.97
CR003364	47.13	10.61	24.68	5.15	23.03	5.74
CR003365	60.68	5.25	17.77	1.57	43.82	3.73
CR003366	69.98	8.84	20.77	3.10	50.32	5.69
CR003367	66.29	4.48	33.62	4.14	33.48	0.51
CR003368	31.57	11.73	3.08	0.92	29.69	11.32
CR003369	24.19	6.89	7.12	2.27	17.38	4.76
CR003370	39.16	11.59	4.83	1.79	35.55	10.35

CR003371	40.47	7.68	6.07	0.89	35.65	7.01
CR003372	21.52	6.02	4.89	1.66	17.25	4.58
CR003373	27.29	4.45	3.31	0.66	25.12	4.12
CR003374	3.10	0.68	0.45	0.24	2.87	0.54
CR003375	2.38	0.22	0.26	0.14	2.25	0.12
CR003376	19.42	5.60	1.37	0.45	18.55	5.28
CR003377	34.93	5.47	5.59	0.88	29.89	4.71
CR003378	40.73	4.63	9.73	1.85	32.27	2.91
CR003379	19.18	5.17	3.38	0.77	16.48	4.32
CR003380	31.76	5.81	3.29	0.57	29.29	5.42
CR003381	99.70	0.17	1.92	0.20	99.70	0.17
CR003382	34.47	5.71	0.14	0.16	34.47	5.71
CR003383	42.89	10.14	2.14	0.56	41.19	9.67
CR003384	17.03	1.95	0.84	0.30	16.29	1.84
CR003386	69.40	19.41	0.53	0.23	69.34	19.32
CR003387	25.64	3.69	0.23	0.07	25.55	3.62
CR003388	59.48	4.29	3.88	0.68	56.45	4.45
CR003389	62.32	1.97	13.19	1.18	50.90	1.02
CR003390	18.97	4.82	3.31	0.91	16.49	3.98
CR003391	61.31	13.21	2.10	0.51	59.70	12.76
CR003392	28.37	8.58	1.93	0.73	26.98	7.94

[232] В Таблице 6 представлены показатели в процентах средних значений и стандартных отклонений для редактирования, инсерций (Ins) и делеций (Del) в тестируемых crRNA TTR, которые совместно трансфицированы с мРНК Spv Cas9 (SEQ ID NO:2) в клеточной линии гепатоцеллюлярной карциномы человека HepG2.

Таблица 6: Результаты редактирования TTR в клетках HepG2 HUH7, трансфицированных мРНК Spv Cas9 и dgRNA

Идент-р гида	Среднее значение редактир ования, в %	Стандарт. отклон. для редактир ования, в %	Среднее к-во инсерций, в %	Станд. отклонен ие инсерций в %	Среднее количес тво делеций, в%	Станд. отклонен ие делеций, в %
CR001261 (контроль)	49.16	7.45	16.46	3.46	32.71	4.06

CR001262 (контроль)	63.33	5.66	59.88	4.92	3.45	0.86
CR001263 (control)	39.19	6.98	37.59	8.01	1.60	1.92
CR001264 (контроль)	57.09	12.14	47.47	9.25	9.61	2.89
CR003335	37.19	2.12	32.96	1.67	4.23	0.59
CR003336	31.31	5.47	30.48	5.10	0.83	0.75
CR003337	61.93	2.68	59.28	2.11	2.65	1.39
CR003338	68.00	6.09	65.40	6.78	2.60	1.17
CR003339	68.21	7.67	12.37	1.47	55.84	6.31
CR003340	37.76	6.01	6.12	1.95	31.65	4.07
CR003341	15.60	5.49	9.94	3.38	5.66	2.13
CR003342	11.06	6.71	10.78	6.69	0.28	0.03
CR003343	45.41	15.20	40.05	10.79	5.36	5.20
CR003344	33.43	6.11	29.81	5.09	3.62	1.13
CR003345	10.58	9.25	6.12	5.38	4.45	3.87
CR003346	0.13	0.05	0.07	0.02	0.05	0.03
CR003347	22.57	10.94	21.08	11.19	1.49	0.90
CR003348	38.44	10.45	17.04	5.04	21.40	5.89
CR003349	8.36	2.19	4.46	1.75	3.91	0.76
CR003350	29.60	5.17	25.16	4.56	4.44	0.67
CR003351	57.54	5.67	31.98	2.63	25.57	3.08
CR003352	44.28	8.71	39.51	7.10	4.77	1.79
CR003353	60.40	11.37	56.71	9.95	3.68	1.45
CR003354	5.36	3.94	4.84	3.41	0.53	0.71
CR003355	15.80	5.38	12.36	4.23	3.44	1.16
CR003356	9.39	1.82	5.67	1.03	3.72	0.92
CR003357	45.83	10.66	42.37	8.47	3.46	2.28
CR003358	35.93	7.34	28.66	7.76	7.27	1.77
CR003359	64.44	14.90	48.79	14.32	15.65	1.94
CR003360	41.31	12.23	38.94	10.60	2.38	1.78
CR003361	14.05	4.79	11.47	4.35	2.58	0.43
CR003362	17.44	4.34	16.50	4.86	0.94	0.52

CR003363	42.65	9.90	28.58	6.95	14.07	3.01
CR003364	51.88	7.67	31.03	2.67	20.85	5.03
CR003365	46.88	15.78	35.77	13.49	11.11	2.30
CR003366	54.69	9.10	46.20	8.98	8.49	1.11
CR003367	45.55	8.19	24.28	6.57	21.27	1.62
CR003368	51.55	8.60	48.34	9.87	3.22	1.36
CR003369	22.62	4.01	17.11	4.47	5.51	2.52
CR003370	28.51	6.94	24.88	6.17	3.62	1.45
CR003371	15.91	4.17	14.07	4.02	1.84	0.22
CR003372	14.57	2.47	12.14	2.08	2.42	0.40
CR003373	17.69	8.41	15.92	6.44	1.77	1.97
CR003374	5.43	0.53	5.12	0.62	0.31	0.36
CR003375	2.06	0.04	1.96	0.06	0.10	0.03
CR003376	14.41	3.01	14.16	2.93	0.24	0.10
CR003377	16.30	2.85	15.29	2.59	1.02	0.59
CR003378	8.16	3.83	6.82	3.43	1.34	0.61
CR003379	19.74	4.24	17.70	4.30	2.04	0.33
CR003380	17.08	2.48	14.78	1.18	2.30	1.36
CR003381	6.81	3.48	6.18	3.82	0.63	0.44
CR003382	1.73	0.14	1.58	0.12	0.15	0.03
CR003383	6.35	1.67	6.19	1.68	0.16	0.04
CR003384	3.37	0.88	3.12	0.94	0.25	0.09
CR003385	53.94	9.41	46.32	10.66	7.62	1.29
CR003386	2.71	0.76	2.15	0.77	0.56	0.53
CR003387	1.39	0.15	1.27	0.17	0.12	0.02
CR003388	9.33	4.47	7.76	4.56	1.56	0.10
CR003389	31.84	6.09	27.27	5.96	4.57	1.21
CR003390	24.88	4.96	22.44	3.41	2.44	2.25
CR003391	48.78	14.41	48.28	14.44	0.50	0.52
CR003392	14.64	5.25	14.32	4.95	0.33	0.36
CR005298	42.65	10.94	21.29	8.16	21.36	2.87
CR005299	38.61	5.57	36.32	3.99	2.30	2.11
CR005300	64.34	9.55	53.20	6.59	11.15	3.33
CR005301	37.04	5.32	33.39	3.85	3.65	1.89

CR005302	33.21	2.19	30.93	2.43	2.29	0.24
CR005303	21.63	6.05	20.55	5.80	1.08	0.25
CR005304	62.82	3.28	8.07	1.22	54.75	4.27
CR005305	13.51	3.58	12.30	3.49	1.21	0.84
CR005306	24.07	5.24	21.20	5.03	2.87	1.10
CR005307	22.03	3.86	7.70	1.35	14.33	4.15

[233] В Таблице 7 представлены показатели в процентах средних значений и стандартных отклонений для редактирования, инсерций (Ins) и делеций (Del) в тестируемых dgRNA TTR, которые электропорированы с белком Spy Cas9 (RNP) в первичных гепатоцитах человека.

Таблица 7: Результаты редактирования TTR в первичных гепатоцитах человека нагруженных dgRNA, электропорированных с белком Spy Cas9

Идент-к гида	Среднее значение редактир ования, в %	Стандарт. отклон для редактир ования, в %	Среднее к-во инсерций, в %	Станд. отклонен ие инсерций в %	Среднее количест во делеций, в%	Станд. отклонен ие делеций, в %
CR003335	72.20	4.53	69.70	4.36	2.50	0.30
CR003336	39.17	3.04	38.43	3.20	0.70	0.17
CR003337	54.27	2.70	53.23	3.05	1.30	0.26
CR003338	83.03	4.84	80.87	4.63	2.13	0.25
CR003339	43.00	2.66	8.93	1.86	34.07	1.72
CR003340	12.03	1.55	5.60	1.32	6.50	0.53
CR003341	11.43	0.71	7.03	0.50	4.40	1.21
CR003342	32.77	3.63	31.87	3.28	0.90	0.35
CR003343	77.10	2.21	75.63	2.01	1.50	0.36
CR003344	39.40	3.86	33.30	2.52	6.10	1.31
CR003345	48.07	6.24	34.53	2.95	13.57	3.74
CR003346	35.67	1.80	20.83	1.65	14.83	1.66
CR003347	82.30	5.93	81.97	5.98	0.43	0.15
CR003348	28.53	1.79	11.30	2.46	17.27	0.86
CR003349	4.10	0.17	2.33	0.46	1.87	0.25
CR003350	28.13	3.50	22.40	2.41	5.73	1.22
CR003351	51.77	5.11	30.83	3.32	20.97	2.43

CR003352	29.83	4.18	25.63	3.67	4.30	0.56
CR003353	84.83	4.68	82.23	4.05	2.63	0.74
CR003354	2.50	0.36	2.43	0.32	0.03	0.06
CR003355	12.53	1.54	10.60	2.36	1.97	1.17
CR003356	9.97	2.68	7.80	2.01	2.23	0.85
CR003357	36.23	4.02	35.47	4.11	0.77	0.61
CR003358	5.70	1.42	4.93	1.36	0.80	0.26
CR003359	63.77	7.07	56.33	5.81	7.50	1.35
CR003360	32.23	3.09	31.67	2.97	0.63	0.31
CR003361	4.10	0.36	3.73	0.42	0.37	0.06
CR003362	7.03	1.30	6.87	1.20	0.20	0.20
CR003363	9.43	8.22	7.80	6.86	1.63	1.44
CR003364	23.30	5.20	16.93	4.96	6.53	0.55
CR003365	42.37	3.88	35.57	1.88	6.83	2.00
CR003366	34.70	3.26	31.63	2.98	3.10	1.15
CR003367	39.20	5.31	22.93	4.14	16.37	1.46
CR003368	28.47	3.29	27.63	2.90	0.80	0.66
CR003369	3.67	1.16	3.30	1.06	0.40	0.20
CR003370	15.27	1.75	14.43	1.72	0.90	0.20
CR003371	16.20	2.13	14.47	2.37	1.87	0.81
CR003372	12.17	2.69	10.47	2.63	1.77	0.12
CR003373	0.87	0.21	0.83	0.25	0.07	0.12
CR003374	0.80	0.17	0.70	0.26	0.10	0.10
CR003375	1.33	1.10	1.27	1.08	0.07	0.06
CR003376	1.90	1.06	1.87	1.00	0.03	0.06
CR003377	10.23	1.53	10.13	1.51	0.10	0.10
CR003378	4.60	1.92	3.87	1.19	0.73	0.67
CR003379	6.57	1.00	6.30	0.70	0.27	0.31
CR003380	5.37	2.57	5.27	2.54	0.10	0.10
CR003381	6.20	2.74	5.83	2.61	0.50	0.10
CR003382	8.40	2.07	8.10	1.87	0.43	0.21
CR003383	8.57	0.75	3.37	0.67	5.27	0.46
CR003384	1.87	0.67	1.73	0.57	0.23	0.12
CR003385	40.87	6.86	38.43	6.41	2.53	0.45

CR003386	4.90	1.20	4.47	1.14	0.47	0.25
CR003387	1.87	0.25	1.70	0.26	0.20	0.10
CR003388	5.70	0.40	5.47	0.40	0.27	0.12
CR003389	27.67	2.76	27.20	2.88	0.50	0.36
CR003390	15.97	3.86	15.80	3.99	0.23	0.15
CR003391	29.77	3.85	29.57	3.85	0.27	0.06
CR003392	4.13	1.21	4.00	1.15	0.17	0.06
CR005298	39.90	2.92	22.37	3.04	17.57	0.42
CR005299	8.65	0.78	8.30	0.99	0.35	0.21
CR005300	57.47	1.69	53.47	1.86	4.10	0.92
CR005301	25.37	1.65	24.00	2.26	1.60	0.82
CR005302	61.10	5.20	60.10	4.77	1.00	0.46
CR005303	53.57	8.52	53.07	8.36	0.53	0.47
CR005304	67.00	5.80	5.53	1.37	61.63	6.98
CR005305	3.83	0.78	3.53	0.61	0.40	0.17
CR005306	9.43	1.63	8.07	2.17	1.37	0.72
CR005307	8.17	1.20	5.20	0.87	3.00	0.82

[234] В Таблице 8 представлены показатели в процентах средних значений и стандартных отклонений для редактирования, инсерций (Ins) и делеций (Del) в тестируемых TTR и контрольных dgRNA, которые трансфицированы с белком Spy Cas9 (RNP) в первичных гепатоцитах человека.

Таблица 8: Результаты редактирования TTR в первичных гепатоцитах человека трансфицированных Spy Cas9, нагруженными dgRNA

Идент-р гида	Среднее значение редактир ования, в %	Стандарт. отклон. для редактир ования, в %	Среднее к-во инсерций, в %	Станд. отклонен ие инсерций в %	Среднее количест во делеций, в%	Станд. отклонен ие делеций, в %
CR001261	32.51	1.00	12.50	0.47	20.01	0.59
CR001262	50.09	1.48	45.25	1.69	4.83	0.31
CR001263	15.25	2.41	14.83	2.37	0.42	0.10
CR001264	45.30	3.48	23.87	2.09	21.43	1.68
CR003335	51.14	4.27	49.51	4.04	1.63	0.25
CR003336	30.70	2.41	30.11	2.48	0.58	0.11

CR003337	49.43	4.75	47.54	4.49	1.88	0.47
CR003338	61.34	3.55	59.13	3.44	2.22	0.11
CR003339	45.06	9.83	8.85	1.65	36.21	8.34
CR003340	10.44	2.44	5.94	1.34	4.50	1.16
CR003341	19.66	3.67	14.64	3.31	5.02	0.37
CR003342	20.66	2.55	19.85	2.54	0.81	0.15
CR003343	43.25	4.47	41.61	4.26	1.63	0.33
CR003344	35.45	13.12	30.97	11.72	4.48	1.51
CR003345	28.90	6.33	21.00	5.23	7.91	1.81
CR003346	4.11	1.36	2.27	0.53	1.84	0.85
CR003347	66.35	4.48	66.11	4.51	0.24	0.08
CR003348	23.18	2.16	13.74	1.17	9.44	0.99
CR003349	10.83	1.57	9.00	1.41	1.83	0.32
CR003350	24.84	2.74	19.77	1.91	5.07	0.89
CR003351	40.28	1.31	23.92	0.70	16.36	0.78
CR003352	30.48	1.93	27.27	2.31	3.21	0.38
CR003353	61.54	4.13	59.38	4.04	2.16	0.11
CR003354	10.31	1.47	10.07	1.50	0.23	0.11
CR003355	19.11	0.92	17.69	0.79	1.42	0.44
CR003356	7.53	1.78	6.24	1.51	1.29	0.32
CR003357	49.35	2.53	48.45	2.54	0.90	0.13
CR003358	31.62	5.97	25.95	5.03	5.67	1.04
CR003359	59.47	6.05	50.96	5.69	8.51	0.54
CR003360	31.47	4.12	30.27	4.21	1.19	0.22
CR003361	13.08	1.48	12.52	1.45	0.56	0.18
CR003362	11.65	1.24	11.10	1.06	0.56	0.36
CR003363	27.65	2.84	21.47	2.39	6.18	0.61
CR003364	35.29	3.50	23.93	2.63	11.36	1.16
CR003365	47.78	3.67	40.24	3.12	7.54	0.72
CR003366	42.74	3.41	37.95	2.88	4.79	0.60
CR003367	31.19	4.60	16.06	2.66	15.13	1.94
CR003368	34.83	5.05	33.83	5.09	1.00	0.10
CR003369	12.98	0.26	11.67	0.21	1.31	0.11
CR003370	20.06	1.79	18.80	1.65	1.26	0.28

CR003371	18.80	2.73	17.23	2.34	1.57	0.43
CR003372	17.56	2.26	15.74	2.16	1.81	0.10
CR003373	3.64	0.29	3.44	0.30	0.19	0.07
CR003374	2.65	0.33	2.52	0.33	0.14	0.02
CR003375	5.04	0.66	4.93	0.66	0.11	0.01
CR003376	5.00	1.10	4.86	1.10	0.14	0.03
CR003377	12.77	2.00	12.45	1.84	0.31	0.18
CR003378	8.66	1.90	8.24	1.74	0.42	0.19
CR003379	16.86	2.62	16.51	2.62	0.34	0.08
CR003380	8.17	1.42	7.71	1.47	0.46	0.10
CR003381	7.15	0.73	6.88	0.67	0.27	0.07
CR003382	2.44	0.06	2.28	0.05	0.15	0.03
CR003383	4.76	0.40	4.52	0.42	0.24	0.09
CR003384	3.56	0.26	3.39	0.26	0.17	0.01
CR003385	41.15	6.06	38.15	5.59	3.00	0.48
CR003386	3.22	0.25	2.97	0.27	0.25	0.02
CR003387	1.79	0.11	1.68	0.09	0.11	0.04
CR003388	5.43	1.03	4.38	1.00	1.05	0.25
CR003389	19.87	4.39	19.19	4.52	0.68	0.24
CR003390	16.09	2.84	15.85	2.91	0.24	0.09
CR003391	34.72	8.29	34.46	8.35	0.26	0.06
CR003392	10.07	1.06	9.93	1.02	0.14	0.04
CR005298	32.07	1.02	21.12	1.02	10.95	0.15
CR005299	19.37	0.61	18.79	0.51	0.58	0.13
CR005300	57.23	6.24	53.62	5.44	3.61	0.87
CR005301	31.37	3.02	29.53	2.88	1.84	0.15
CR005302	48.29	5.22	47.32	5.32	0.97	0.14
CR005303	36.45	4.83	36.06	4.72	0.39	0.12
CR005304	49.45	6.85	4.32	0.31	45.13	6.74
CR005305	7.07	1.43	6.73	1.30	0.34	0.17
CR005306	18.81	1.82	16.24	1.57	2.57	0.35
CR005307	18.73	1.68	10.18	0.92	8.55	0.88

[235] В Таблице 9 представлены показатели в процентах средних значений и стандартных отклонений для редактирования, инсерций (Ins) и делеций (Del) в тестируемых

TTR и контрольных dgRNA, которые совместно трансфицированы с мПНК Spу Cas9 (SEQ ID NO:2) в первичных гепатоцитах человека.

Таблица 9: Результаты редактирования TTR в первичных гепатоцитах человека трансфицированных мПНК Spу Cas9 и dgRNA

Идент-р гида	Среднее значение редактир ования, в %	Стандарт. отклон для редактир ования, в %	Среднее к-во инсерций, в %	Станд. отклонен ие инсерций в %	Среднее количест во делеций, в%	Станд. отклонен ие делеций, в %
CR001261	32.33	4.95	5.83	1.63	26.47	3.30
CR001262	41.50	4.71	34.43	3.31	7.13	1.42
CR001263	10.23	3.61	9.40	3.20	0.90	0.44
CR001264	42.80	0.50	11.90	1.32	30.90	1.80
CR003335	36.43	2.98	33.03	2.31	3.40	0.70
CR003336	16.93	3.78	16.20	3.41	0.80	0.44
CR003337	19.30	1.57	18.10	1.44	1.23	0.15
CR003338	36.30	9.55	33.73	9.27	2.73	0.49
CR003339	36.43	1.21	2.27	0.15	34.23	1.31
CR003340	24.97	2.78	1.83	0.23	23.17	2.66
CR003341	15.83	1.38	6.80	0.53	9.07	0.81
CR003342	22.10	1.27	20.60	0.57	1.50	0.71
CR003343	55.03	0.38	52.40	0.53	2.60	0.44
CR003344	31.50	1.30	22.40	1.31	9.20	0.10
CR003345	50.65	2.90	32.30	1.56	18.45	1.20
CR003346	19.97	1.94	5.63	0.55	14.33	1.72
CR003347	41.47	3.59	41.33	3.63	0.17	0.06
CR003348	18.00	0.87	2.30	0.66	15.80	0.61
CR003349	2.57	0.81	0.90	0.35	1.70	0.46
CR003350	26.63	4.25	16.33	2.45	10.33	1.75
CR003351	26.50	1.61	10.20	0.92	16.37	0.97
CR003352	16.80	5.03	11.73	3.86	5.07	1.14
CR003353	53.73	6.01	49.50	5.82	4.43	0.75
CR003354	2.97	0.95	2.87	0.85	0.13	0.12
CR003355	12.07	2.61	10.47	2.08	1.63	0.59

CR003356	7.27	0.72	4.70	0.53	2.67	0.21
CR003357	25.93	4.55	25.30	4.22	0.63	0.35
CR003358	3.90	0.79	2.73	0.45	1.17	0.51
CR003359	32.93	4.34	25.67	3.25	7.33	1.24
CR003360	14.90	4.85	14.13	4.66	0.90	0.52
CR003361	3.53	0.60	2.73	0.55	0.87	0.15
CR003362	6.60	1.47	6.17	1.45	0.47	0.21
CR003363	16.70	1.08	11.80	0.79	4.93	0.60
CR003364	15.63	2.45	6.73	0.81	8.93	1.70
CR003365	26.90	3.05	20.23	2.02	6.67	1.16
CR003366	24.53	1.26	20.47	1.45	4.07	0.23
CR003367	37.33	1.40	14.03	0.40	23.37	1.25
CR003368	11.10	1.91	10.53	1.90	0.60	0.10
CR003369	1.60	0.46	0.90	0.20	0.70	0.36
CR003370	2.83	0.57	2.33	0.40	0.50	0.17
CR003371	3.40	0.80	2.67	0.75	0.73	0.15
CR003372	1.77	0.75	1.13	0.57	0.63	0.23
CR003373	1.40	0.36	1.00	0.35	0.37	0.12
CR003374	0.27	0.21	0.27	0.21	0.03	0.06
CR003375	1.27	0.64	1.23	0.58	0.03	0.06
CR003376	2.83	0.81	2.73	0.81	0.13	0.06
CR003377	17.53	6.35	16.97	6.11	0.57	0.25
CR003378	9.80	1.37	8.50	1.21	1.37	0.15
CR003379	13.20	1.18	12.00	1.05	1.27	0.15
CR003380	2.93	0.58	2.47	0.57	0.47	0.15
CR003381	4.07	1.21	3.33	0.96	0.73	0.25
CR003382	0.97	0.25	0.97	0.25	0.00	0.00
CR003383	15.70	3.22	2.07	0.35	13.70	2.82
CR003384	1.70	0.62	1.50	0.56	0.20	0.10
CR003385	36.77	0.70	33.23	0.74	3.60	0.26
CR003386	8.27	1.63	8.20	1.57	0.13	0.06
CR003387	7.87	1.58	7.80	1.64	0.03	0.06
CR003388	12.97	1.30	11.87	1.21	1.17	0.25
CR003389	44.27	1.72	41.47	1.59	2.83	0.15

CR003390	20.23	2.08	18.73	1.92	1.60	0.17
CR003391	15.47	5.87	15.20	5.72	0.30	0.10
CR003392	2.43	0.55	2.37	0.59	0.07	0.06
CR005298	15.70	2.79	4.13	0.87	11.60	2.00
CR005299	9.43	0.68	8.93	0.68	0.60	0.00
CR005300	31.53	3.44	27.60	2.77	3.97	0.76
CR005301	6.77	1.44	5.47	0.96	1.40	0.61
CR005302	34.80	7.17	33.67	7.01	1.13	0.21
CR005303	35.50	5.90	35.00	5.81	0.50	0.10
CR005304	45.27	4.71	0.83	0.15	44.47	4.57
CR005305	7.53	1.06	5.93	1.10	1.60	0.10
CR005306	9.97	0.38	7.13	0.23	2.87	0.12
CR005307	12.90	2.43	3.67	0.61	9.30	1.80

[236] В Таблице 10 представлены показатели в процентах средних значений и стандартных отклонений для редактирования, инсерций (Ins) и делеций (Del) в тестируемых dgRNA TTR, которые электропорированы с белком Spy Cas9 (RNP) в первичных гепатоцитах обезьяны.

Таблица 10: Результаты редактирования TTR в первичных гепатоцитах обезьяны, электропорированных с белком Spy Cas9 и dgRNA

Идент-р гида	Среднее значение редактир ования, в %	Стандарт. отклон. для редактир ования, в %	Среднее к-во инсерций, в %	Станд. отклонен ие инсерций в %	Среднее количес тво делеций, в%	Станд. отклонен ие делеций, в %
CR003336	8.18	1.93	8.10	1.94	0.07	0.01
CR003337	24.94	5.80	24.10	4.71	0.84	1.10
CR003338	44.94	9.99	44.89	9.97	0.05	0.01
CR003339	8.95	0.89	4.93	0.64	4.02	0.25
CR003340	12.53	2.22	7.72	0.13	4.80	2.09
CR003341	8.43	10.53	7.66	9.91	0.77	0.63
CR003344	35.72	4.67	33.81	5.29	1.91	0.61
CR003345	52.92	3.26	30.74	0.78	22.19	2.48
CR003346	1.91	0.86	1.82	0.82	0.09	0.04
CR003347	72.41	0.38	72.15	0.73	0.25	0.34

CR003352	1.25	0.20	1.16	0.21	0.09	0.01
CR003353	4.75	0.43	4.67	0.47	0.08	0.04
CR003358	20.47	0.30	19.01	0.51	1.46	0.21
CR003359	46.17	1.14	40.66	2.00	5.51	0.86
CR003360	29.47	0.63	29.05	1.00	0.42	0.37
CR003361	4.53	0.14	4.46	0.18	0.08	0.04
CR003362	4.59	0.80	4.36	0.77	0.22	0.03
CR003363	15.64	1.92	13.24	2.65	2.39	0.73
CR003364	19.62	2.54	14.27	2.72	5.35	0.17
CR003365	10.31	1.81	9.33	1.80	0.97	0.01
CR003366	18.52	0.71	17.62	0.33	0.90	0.39
CR003368	18.56	3.89	18.30	3.77	0.26	0.11
CR003369	1.53	0.25	1.28	0.40	0.25	0.15
CR003370	2.52	0.64	2.40	0.63	0.12	0.01
CR003371	1.83	0.38	1.69	0.41	0.14	0.03
CR003372	2.15	0.30	1.83	0.33	0.32	0.04
CR003382	10.86	2.04	8.54	1.93	2.33	0.11
CR003383	8.86	2.30	4.31	0.69	4.55	1.61
CR003384	3.75	0.35	2.50	0.37	1.25	0.02
CR003385	30.96	1.61	26.84	2.20	4.12	0.59
CR003386	5.54	1.42	3.51	1.26	2.03	0.15
CR003387	4.72	0.03	4.55	0.08	0.17	0.11
CR003388	6.81	0.17	6.59	0.28	0.22	0.11
CR003389	18.83	4.99	18.05	4.92	0.78	0.07
CR003390	16.87	3.88	16.49	3.48	0.39	0.39
CR003391	36.44	1.09	35.73	1.37	0.71	0.28
CR003392	7.02	0.97	6.63	0.59	0.38	0.37
CR005299	13.48	2.96	13.23	2.74	0.26	0.22
CR005301	46.76	1.75	46.34	2.19	0.42	0.44
CR005302	1.34	0.19	1.26	0.19	0.08	0.00
CR005303	59.28	1.05	58.72	1.06	0.56	0.00
CR005305	11.28	0.39	11.13	0.39	0.15	0.00
CR005307	4.56	0.71	2.01	0.49	2.55	0.21

[237] В Таблице 11 представлены в процентах показатели средних значений и

стандартных отклонений для редактирования, инсерций (Ins) и делеций (Del) в тестируемых dgRNA TTR, которые электропорированы с белком Spy Cas9 (RNP) в первичных гепатоцитах обезьяны.

Таблица 11: Результаты редактирования TTR в первичных гепатоцитах обезьяны, электропорированных с белком Spy Cas9 и специфическими dgRNA обезьяны

Идент-р гида	Среднее значение редактирования, в %	Стандарт. отклон. для редактирования, в %	Среднее количество инсерций, в %	Станд. отклонение инсерций, в %	Среднее количество делеций, в %	Станд. отклонение делеций, в %
CR000689	24,41	1,67	18,11	2,41	6,30	0,93
CR005364	27,70	0,74	0,58	0,29	27,11	0,60
CR005365	64,94	2,03	0,10	0,04	64,85	2,05
CR005366	77,00	1,17	0,33	0,27	76,67	0,99
CR005367	50,79	0,53	0,53	0,25	50,26	0,36
CR005368	27,60	2,07	0,33	0,45	27,27	2,32
CR005369	42,01	0,33	8,09	0,55	33,92	0,31
CR005370	63,52	3,21	0,59	0,33	62,93	2,88
CR005371	8,42	0,69	0,31	0,12	8,10	0,57
CR005372	17,98	1,39	0,83	0,77	17,16	0,71

Пример 3. Скрининг последовательностей sgRNA

Перекрестный скрининг sgRNA TTR во множественных типах клеток

[238] Гида в модифицированном формате sgRNA, таргетные к TTR человека и обезьяны, доставлялись в первичные гепатоциты человека и первичные гепатоциты обезьяны как представлено в Примере 1. Процент редактирования определялся для crRNA, включая каждую последовательность гида для каждого типа клеток, а затем последовательности гида нормировались относительно самого высокого процента редактирования. Результаты скрининга последовательностей гида Таблицы 2 для обеих линий клеток представлены далее в Таблицах 12-15.

[239] В Таблице 12 представлены в процентах средние значения и показатели стандартного отклонения для редактирования, инсерций (Ins) и делеций (Del) в тестируемых TTR sgRNA, трансфицированных белком Spy Cas9 (RNP) в первичных гепатоцитах человека.

Таблица 12: Результаты редактирования TTR в первичных гепатоцитах человека, которые трансфицированы белком Spy Cas9 и sgRNA

Идент-р гида	Среднее значение	Стандарт. отклон.	Среднее к-во	Станд. отклонение	Среднее количество	Станд. отклонение
--------------	------------------	-------------------	--------------	-------------------	--------------------	-------------------

	редактиро вания, в %	для редактиро вания, в %	инсерций, в %	е инсерций в %	делеций, в%	делеций, в %
G000480	81,80	1,98	77,15	2,19	4,70	0,28
G000481	46,90	1,71	27,77	3,88	19,43	4,76
G000482	66,67	2,35	56,57	4,14	10,10	1,85
G000483	47,90	6,56	19,57	3,37	28,50	3,25
G000484	62,97	0,90	29,23	0,21	33,83	0,95
G000485	56,07	3,37	53,07	2,84	3,13	0,60
G000486	69,73	6,86	9,83	1,93	59,93	5,63
G000487	67,30	2,75	65,27	3,41	2,07	1,06
G000488	61,27	1,95	26,30	1,55	35,00	1,30
G000489	60,17	2,75	51,07	3,18	9,43	0,45
G000490	55,90	7,88	46,13	7,55	9,80	0,69
G000491	74,30	1,55	70,27	2,37	4,33	0,72
G000492	60,97	5,81	57,90	4,64	3,13	1,35
G000493	41,40	3,08	38,90	3,29	2,67	0,35
G000494	62,23	3,30	61,47	3,25	0,77	0,31
G000495	50,80	1,85	45,80	1,25	5,37	0,64
G000496	72,33	1,63	44,73	2,14	27,67	1,46
G000497	59,67	1,40	51,10	1,14	8,73	0,71
G000498	72,80	3,75	60,17	3,12	12,70	0,72
G000499	66,40	3,55	65,23	3,72	1,17	0,38
G000500	65,53	1,21	62,00	1,11	3,83	0,40
G000501	60,93	1,91	55,13	1,43	6,00	0,56

[240] В Таблице 13 представлены в процентах средние значения и показатели стандартного отклонения, при 12,5 нМ, для редактирования, инсерций (Ins) и делеций в тестируемых sgRNA *TTR*, которые трансфицированы совместно с мРНК Spv Cas9 (SEQ ID NO:2) в первичных гепатоцитах человека.

Таблица 13: Результаты редактирования *TTR* в первичных гепатоцитах человека, которые трансфицированы с мРНК Spv Cas9 и sgRNA

Идент-р гена	Среднее значение редактиро вания, в %	Стандарт. отклон. для редактиро	Среднее к- во инсерций, в %	Станд. отклонени е инсерций в %	Среднее количество делеций, в%	Станд. отклонение делеций, в %
--------------	--	--	--------------------------------------	--	---	---

		вания, в %				
G000480	73,28	0,61	59,85	0,13	13,47	0,51
G000481	34,30	5,26	14,62	2,59	19,77	2,72
G000482	40,93	3,95	27,70	2,92	13,25	0,97
G000483	27,82	2,93	4,05	0,51	23,85	2,43
G000484	43,37	6,79	13,98	2,61	29,48	4,15
G000485	30,82	5,76	28,87	5,50	1,97	0,28
G000486	59,13	5,62	2,82	0,86	56,37	4,92
G000487	49,57	0,99	47,38	0,89	2,27	0,24
G000488	49,40	5,05	11,98	1,40	37,48	3,68
G000489	24,25	2,82	14,17	2,01	10,28	1,38
G000490	24,72	2,35	19,38	2,04	5,38	0,41
G000491	45,93	1,22	42,42	1,06	3,60	0,33
G000492	34,65	2,21	32,45	2,01	2,22	0,25
G000493	11,55	1,35	10,65	1,58	0,97	0,30
G000494	26,22	4,03	25,17	3,89	1,07	0,15
G000495	47,77	1,88	43,40	1,91	4,45	0,17
G000496	63,30	2,60	11,08	2,10	52,25	0,67
G000497	40,33	3,32	34,48	2,71	5,85	0,61
G000498	60,02	5,42	45,20	4,34	14,90	1,08
G000499	39,30	6,04	38,58	5,86	0,77	0,12
G000500	35,50	0,61	32,47	0,49	3,10	0,18
G000501	40,32	1,50	33,82	2,04	6,62	0,55
G000567	27,28	7,59	17,35	4,72	10,02	2,94
G000568	43,75	5,83	43,00	5,81	0,80	0,18
G000570	68,42	3,64	68,08	3,61	0,35	0,00
G000571	20,47	3,41	14,47	2,72	6,13	0,78
G000572	55,42	8,13	41,62	6,48	13,85	1,60

[241] В Таблице 14 представлены в процентах показатели средних значений и стандартных отклонений для редактирования, инсерций (Ins) и делеций в тестируемых sgRNA *TTR*, которые электропорированы с белком Spу Cas9 (RNP) в первичных гепатоцитах обезьяны. Примечание: гиды G000480 и G000488 имеют одно несоответствие с обезьяной, что может поставить под угрозу эффективность их редактирования в клетках обезьяны

Таблица 14: Результаты редактирования TTR в первичных гепатоцитах обезьяны,

которые электропорированы с белком Spy Cas9 и sgRNA

Идент-р гида	Среднее значение редактирования, в %	Стандарт. отклон. для редактирования, в %	Среднее количество инсерций, в %	Станд. отклонение инсерций, в %	Среднее количество делеций, в %	Станд. отклонение делеций, в %
G000480	10,20	0,56	9,83	0,81	0,37	0,25
G000481	69,13	8,62	33,73	2,67	35,50	11,23
G000482	75,17	2,34	55,23	2,00	20,03	0,85
G000485	22,93	0,95	22,00	0,82	1,07	0,21
G000486	79,90	0,79	11,90	0,85	68,07	0,35
G000488	9,63	0,50	5,37	0,38	4,27	0,35
G000489	67,53	1,15	53,53	1,56	14,17	0,64
G000490	61,67	0,72	54,47	1,10	7,27	1,23
G000491	66,20	1,11	64,37	0,47	1,90	0,70
G000493	50,13	0,74	48,07	1,69	2,10	0,98
G000494	81,53	0,71	79,57	0,49	2,07	0,67
G000498	91,37	1,48	68,50	1,64	22,87	1,50
G000499	83,40	0,36	82,00	0,20	1,43	0,55
G000500	45,20	3,66	42,60	3,80	2,63	0,25

[242] В Таблице 15 представлены показатели в процентах средних значений и стандартных отклонений для редактирования, инсерций (Ins) и делеций (Del) в тестируемых sgRNA TTR, специфических для обезьяны, которые электропорированы с белком Spy Cas9 (RNP) в первичных гепатоцитах обезьяны.

Таблица 15: Результаты редактирования TTR в первичных гепатоцитах обезьяны, электропорированных с белком Spy Cas9 и специфическими для обезьяны sgRNA (например, аналогичными gRNA человека, смотрите Таблицу 3)

Идент-р гида	Среднее значение редактирования, в %	Стандарт. отклон. для редактирования, в %	Среднее количество инсерций, в %	Станд. отклонение инсерций, в %	Среднее количество делеций, в %	Станд. отклонение делеций, в %
G000502	95,10	0,96	13,97	1,69	81,27	2,60
G000503	58,53	2,40	52,07	1,68	6,50	2,46
G000504	77,17	0,96	69,73	1,29	7,53	0,57

G000505	95,53	1,06	95,50	1,01	0,10	0,10
G000506	89,43	1,36	86,90	1,64	3,07	0,42
G000507	71,17	3,22	67,03	2,39	4,60	1,65
G000508	45,63	3,01	41,57	2,95	4,17	0,91
G000509	93,03	0,81	43,60	1,30	49,73	1,76
G000510	90,80	0,53	89,13	0,40	1,77	0,12
G000511	62,77	1,63	60,87	1,55	2,00	0,35

Пример 4. Скрининг составов липидных наночастиц (LNP), содержащих мРНК Spу Cas9 и sgRNA

[243] Перекрестный скрининг составов LNP sgRNA TTR с мРНК Spу Cas9 в первичных гепатоцитах человека и первичных гепатоцитах обезьяны.

[244] В составах липидных наночастиц тестировались зависимость доза /ответ модифицированных sgRNAs таргетных к TTR человека и обезьяны на культурах первичных гепатоцитов человека и первичных гепатоцитов обезьяны. Первичные гепатоциты человека и обезьяны наносили на планшет, как представлено в Примере 1. Обе клеточные линии инкубировались при 37°C в атмосфере 5% CO₂ в течение 24 часов перед обработкой LNP. Экспериментальные образцы LNP, которые подробно представлены в Таблицах 16-19, готовились по методике Nanoassembly™. Каждый образец включал выбранные sgRNA, мРНК Cas9 (SEQ ID №:2) и липид. LNP содержали липид А, холестерин, DSPC, и PEG 2k-DMG в молярном соотношении 45:44:9:2, соответственно, с соотношением N:P 4,5. LNP инкубировались в среде для культивирования гепатоцитов, содержащей 6% сыворотки обезьяны, при температуре 37°C в течение 5 минут. После инкубации LNP были добавлены к первичным гепатоцитам человека или обезьяны в 8 точках в двух повторах для определения зависимости ответа от дозы, начиная со 100 нг мРНК. Клетки после обработки лизировали в течение 72 часов для анализа NGS как представлено в Примере 1. Процент редактирования определен для sgRNA, включающих каждую последовательность гена для каждого типа клеток и последовательности гена, которые затем нормировались на основе самого высокого процента редактирования для внесенной концентрации 12,5 нг мРНК и 3,9 нМ гена. Результаты определения зависимости ответа от дозы для последовательностей гена в двух линиях клеток представлены на ФИГ. от 4 до 7. Проценты редактирования для внесенной концентрации 12,5 нг мРНК и 3,9 нМ гена представлены далее (Таблицы 16-18).

[245] В Таблице 16 представлены в процентах средние значения и стандартные отклонения при 12,5 нг мРНК Cas9 для редактирования, инсерций (Ins) и делеций (Del) в тестируемых sgRNA TTR, сформированных в липидных наночастицах с мРНК Spу Cas9 на первичных гепатоцитах человека определения зависимости ответа от дозы. G000570 продемонстрировали нехарактерную зависимость ответа от дозы сравнению с другими sgRNA, что может быть артефактом эксперимента. Графически результаты представлены на ФИГ. 4.

Таблица 16: Результаты редактирования TTR в первичных гепатоцитах человека,

которые обработаны составом LNP, включающим мРНК Spу Cas9 (SEQ ID №:2) и sgRNA

Идент-р ГИДА	12,5 нг мРНК, 3,9 нМ sgRNA (среднее значение редактирования, в %)	Стандартное отклонение для показателя редактирования, в %
G000480	59.33	0.73
G000481	24.37	0.37
G000482	19.10	2.64
G000483	7.37	0.67
G000484	16.67	1.23
G000485	14.23	2.36
G000486	61.33	2.59
G000487	17.37	0.95
G000488	44.80	3.00
G000489	16.85	0.06
G000490	10.53	1.90
G000491	31.60	2.33
G000492	15.87	0.44
G000493	7.33	0.73
G000494	6.37	1.07
G000495	23.97	1.66
G000496	30.73	3.76
G000497	15.10	3.30
G000498	24.43	1.30
G000499	16.07	1.67
G000500	23.57	2.44
G000501	32.30	2.49
G000567	48.95	1.06
G000568	54.60	3.68
G000570	88.30	1.84
G000572	55.45	1.20

[246] В Таблице 17 представлены в процентах средние значения и стандартные отклонения при концентрации 12,5 нг мРНК и 3,9 нМ гида для редактирования, инсерций (Ins) и делеций (Del) в тестируемых sgRNA TTR, сформированных в липидных наночастицах с мРНК Spу Cas9 на первичных гепатоцитах обезьяны для определения зависимости ответа от дозы. Графически результаты представлены на ФИГ. 5.

Таблица 17: Результаты редактирования TTR в первичных гепатоцитах обезьяны, которые обработаны составом LNP, включающего мРНК Spу Cas9 (SEQ ID №:2) и sgRNA

Идент-р ГИДА	12,5 нг мРНК, 3,9 нМ sgRNA (среднее значение редактирования, в %)	Стандартное отклонение для показателя редактирования, в %
G000480	0.73	0.15
G000481	49.20	1.39
G000482	26.13	5.33
G000483	0.73	0.60
G000484	0.10	0.00
G000485	1.43	1.02
G000489	31.87	2.40
G000490	15.23	1.08
G000491	6.37	0.38
G000492	0.70	0.28
G000493	7.63	1.14
G000494	14.30	1.06
G000495	0.73	0.06
G000497	0.23	0.06
G000498	37.90	1.42
G000499	14.63	0.70
G000500	10.47	0.32
G000501	1.37	0.31
G000567	0.10	0.00
G000568	9.25	0.21
G000570	17.30	0.85
G000571	20.20	2.26
G000572	30.60	0.42

[247] В Таблице 18 представлены в процентах средние значения и стандартные отклонения при концентрации 12,5 нг мРНК и 3,9 нМ гида для редактирования, инсерций (Ins) и делеций (Del) в тестируемых специфических sgRNA TTR обезьяны, сформированных в липидных наночастицах с мРНК Spу Cas9 на первичных гепатоцитах обезьяны для определения зависимости ответа от дозы. Графически результаты представлены на ФИГ. 6.

Таблица 18: Результаты редактирования TTR в первичных гепатоцитах

обезьяны, обработанных сформированным составом LNP, включающим мРНК Spу Cas9 (SEQ ID №: 2) и модифицированные sgRNA обезьяны

Идент-р ГИДА	12,5 нг м РНК, 3,9 нМ sgRNA, % редактирования	Стандартное отклонение для редактирования, в %
G000502	80.70	0.14
G000506	60.13	0.70
G000509	74.47	7.28
G000510	61.87	2.54

Перекрестный скрининг составов LNP sgRNA TTR с мРНК Spу Cas9 в первичных гепатоцитах человека и первичных гепатоцитах обезьяны.

[248] Составы липидных наночастиц с модифицированными sgRNA, которые таргетны к TTR человека и последовательности sgRNA обезьяны, тестировались на культурах первичных гепатоцитов человека и первичных гепатоцитов обезьяны по зависимости доза /ответ. Первичные гепатоциты человека и обезьяны наносили на планшет, как представлено в Примере 1. Обе клеточные линии инкубировались при температуре 37°C в атмосфере 5% CO₂ в течение 24 часов перед обработкой LNP. Используемые в экспериментах LNP, которые подробно представлены в Таблицах 20-22, были подготовлены по процедуре перекрестного смешивания, как представлено выше, но подверглись очистке на колонках PD-10 (GE Healthcare Life Sciences) и концентрировались с использованием фильтра для центрифугирования Амикон (Millipore, Sigma), каждый из которых включал указанные sgRNA и мРНК Cas9 (SEQ ID №:1). LNP содержали липид А, холестерин, DSPC и PEG 2k-DMG в молярном соотношении 50:38:9:3, соответственно, с соотношением N:P 6,0. LNP инкубировались в среде для культивирования гепатоцитов, содержащей 6% сыворотки обезьяны при температуре 37°C, в атмосфере 5% CO₂, в течение 5 минут. После инкубации LNP были добавлены к первичным гепатоцитам человека или обезьяны в 8 экспериментальных точках с тремя повторами, для определения зависимости ответа от дозы, начиная от 300 нг мРНК. Клетки лизировали в течение 72 часов после обработки для анализа NGS как представлено в Примере 1.

[249] Процент редактирования определен для sgRNA, включающих каждую последовательность гена для каждого типа клеток, и последовательности гена затем нормировались на основании самого высокого процента редактирования для значения EC50 и максимального процента редактирования. Результаты определения зависимости ответа от дозы для последовательностей гена в обеих линиях клеток представлены на ФИГ. от 4 до 7. Значения EC50 и максимальный процент редактирования представлены далее (Таблицы 19-22).

[250] В Таблице 19 представлены значения EC50 и максимального редактирования тестируемых специфических sgRNA TTR человека, которые сформированы в наночастицах липидов с U-истощенной мРНК Spу Cas9 в первичных гепатоцитах человека для

зависимости ответа от дозы. Графически результаты представлены на ФИГ.4.

Таблица 19: Результаты редактирования TTR в первичных гепатоцитах человека, обработанных LNP, сформированными с мРНК Spv Cas9 и специфическими sgRNA человека

Идент-р ГИДА	EC50	Макс.редактирование
G000480	0.10	98.69
G000481	1.43	87.05
G000482	0.65	97.02
G000483	1.88	77.39
G000484	0.95	94.14
G000488	0.72	95.83
G000489	1.38	86.33
G000490	1.52	94.16
G000493	2.42	63.95
G000494	1.28	75.70
G000499	0.63	96.31
G000500	0.39	88.70
G000568	0.78	95.72
G000570	0.23	98.22
G000571	2.21	71.28
G000572	0.42	97.94

[251] В Таблице 20 представлены значения EC50 и максимального редактирования тестируемых sgRNA *TTR* человека, сформированных в наночастицах липидов с U-истощенной мРНК Spv Cas9 в первичных гепатоцитах обезьяны для зависимости ответа от дозы. Графически результаты представлены на ФИГ.16.

Таблица 20: Результаты редактирования TTR в первичных гепатоцитах обезьяны, обработанных LNP, сформированными с мРНК Spv Cas9 и специфическими sgRNA человека

Идент-р ГИДА	EC50	Максимальное редактирование
G000480	5.28	20.32
G000481	0.93	95.07
G000482	0.89	97.47
G000483	4.40	56.52

G000484	3.47	0.22
G000488	11.56	21.63
G000489	1.79	89.21
G000490	3.09	90.76
G000493	4.97	61.15
G000494	2.77	60.84
G000499	2.00	74.94
G000500	4.42	58.04
G000567	1.76	97.06
G000568	1.87	87.93
G000570	2.00	96.73
G000571	1.55	97.03
G000572	0.79	100.31

[251] В Таблице 21 представлены значения EC50 и максимального редактирования sgRNA *TTR обезьяны*, сформированных в наночастицах липидов с U-истощенной мРНК Spv Cas9 в первичных гепатоцитах человека для зависимости ответа от дозы. Графически результаты представлены на ФИГ.17.

Таблица 21: Результаты редактирования TTR в первичных гепатоцитах человека, обработанных LNP, сформированными с мРНК Spv Cas9 и специфическими sgRNA обезьяны

Идент-р ГИДА	EC50	Максимальное редактирование
G000502	0.70	91.50
G000504	5.16	7.16
G000505	3.57	13.48
G000506	1.26	89.49

[252] В Таблице 22 представлены значения EC50 и максимального редактирования sgRNA *TTR обезьяны*, сформированных в наночастицах липидов с U-истощенной мРНК Spv Cas9 в первичных гепатоцитах обезьяны для зависимости ответа от дозы. Графически результаты представлены на ФИГ.18

Таблица 22: Результаты редактирования TTR в первичных гепатоцитах обезьяны, обработанных LNP, сформированными с мРНК Spv Cas9 и специфическими sgRNA обезьяны

Идент-р ГИДА	EC50	Максимальное редактирование
G000502	0.26	100.05

G000503	2.26	83.41
G000504	1.42	98.04
G000505	1.10	99.97
G000506	0.66	99.18

Пример 5. Анализ нетаргетных dgRNA и sgRNA TTR.

Анализ нетаргетных гидов TTR

[253] Для определения потенциальных нетаргетных геномных участков, расщепляемых Cas9, использовался количественный метод определения инсерции олигонуклеотидов (см., например, Tsai с соавторами., Nature Biotechnology 33, 187-197; 2015) для таргетирования TTR. Тестировались сорок пять dgRNA из Таблицы 1 (и два контрольных гида с известными нетаргетными профилями), на клетках линии HEK293_Cas9. Линия эмбриональных клеток аденокарциномы почки человека HEK293, постоянно экспрессирующая Spу Cas9 ("HEK293_Cas9"), культивировалась в среде DMEM, дополненной 10% эмбриональной сывороткой крупного рогатого скота и 500 мкг/мл G418. Клетки наносились при плотности 30 000 клеток/лунка в 96-луночный планшет за 24 часа до трансфекции. Клетки трансфицировались липофектаминол RNAiMAX (ThermoFisher, каталожный номер: 13778150) по протоколу производителя. Клетки были трансфицированы липоплексом, содержащим отдельные crRNA (15 нМ), trRNA (15 нМ) и донорский олигонуклеотид с (10 нМ) Липофектаминол RNAiMAX (0,3 мкл /лунка) и OptiMem. Клетки лизировались через 24 часа после трансфекции и экстракция геномной ДНК была выполнена с помощью набора для экстракции Zymo's Quick gDNA 96 (каталожный номер: D3012) по инструкции представленной производителем. gDNA была определена количественно используя Qubit High Sensitivity dsDNA набор (Life Technologies). Библиотеки были подготовлены в соответствии с ранее представленным методом в Tsai с соавторами, 2015 с небольшими доработками. Секвенирование выполнялось на приборе Illumina's MiSeq and HiSeq 2500. В количественном исследовании идентифицировались потенциальные нетаргетные сайты для некоторых crRNA, которые графически представлены на ФИГ. 2.

[254] В Таблице 23 представлено количество интегрированных нетаргетных сайтов, детектируемых в клетках HekCas9, трансфицированных dgRNA TTR вместе с двойной последовательностью донорского олигонуклеотида ДНК.

Таблица 23: Количество нетаргетных интегрированных сайтов детектируемых для dgRNA TTR на основании оценки инсерции олигонуклеотидов

Идент-р ГИДА	Количество сайтов
CR003335	0
CR003336	2
CR003337	10
CR003338	2

CR003339	3
CR003340	0
CR003342	0
CR003343	2
CR003344	0
CR003345	0
CR003346	0
CR003347	1
CR003348	3
CR003351	1
CR003352	2
CR003353	2
CR003355	1
CR003356	4
CR003357	3
CR003359	6
CR003360	0
CR003363	4
CR003365	3
CR003366	1
CR003367	1
CR003368	2
CR003369	2
CR003377	0
CR003380	0
CR003382	34
CR003383	1
CR003385	3
CR003386	1
CR003387	6
CR003388	2
CR003389	2
CR003390	1
CR003391	0

CR003392	0
CR005298	0
CR005300	0
CR005301	0
CR005302	1
CR005303	1
CR005304	0

[255] Кроме того, оценена субпопуляция гидов с нетаргетным потенциалом как модифицированные sgRNA в Hek_Cas9 клетках с помощью метода определения инсерций олигонуклеотидов, представленного выше. Нетаргетные результаты графически представлены на ФИГ.4.

[256] В Таблице 24 представлено количество интегрированных нетаргетных сайтов, детектируемых в клетках HekCas9, трансфицированных sgRNA *TTR* вместе с двойной последовательностью донорского олигонуклеотида ДНК.

Таблица 24: Количество интегрированных нетаргетных сайтов для sgRNA *TTR*, детектированных способом определения инсерций

Идент-р ГИДА	Количество сайтов
G000480	11
G000481	3
G000482	13
G000483	5
G000484	7
G000485	22
G000486	12
G000487	14
G000488	0
G000489	19
G000490	12
G000491	28
G000492	97
G000493	7
G000494	4
G000495	13
G000496	1
G000497	26

G000498	82
G000499	4
G000500	46
G000501	4
G000567	9
G000568	937
G000570	19
G000571	16
G000572	15

Пример 6. Таргетное секвенирование для валидации потенциальных нетаргетных сайтов

[257] Клетки HEK293_Cas9, которые использовались в Примере 5, для обнаружения потенциальных нетаргетных конститутивно сверхэкспрессируемых Cas9, признаны лидирующими по количеству потенциальных нетаргетных «мишеней», по сравнению с парадигмой транзientной доставки в различные типы клеток. Кроме того, при доставке sgRNA (в отличие от dgRNA) количество потенциальных нетаргетных мишеней может быть дополнительно завышено, поскольку молекулы sgRNA более стабильны, по сравнению с dgRNA (особенно при химических модификациях). Соответственно, потенциальные нетаргетные сайты, идентифицированные способом инсерции олигонуклеотидов, используемые в Примере 5, могут быть валидированы с помощью таргетного секвенирования идентифицированных потенциальных нетаргетных сайтов.

[258] В одном из подходов первичные гепатоциты обрабатывались LNP, включающими представляющие интерес мРНК Cas9 и sgRNA (например, sgRNA, имеющую потенциальные нетаргетные сайты для оценки). Далее первичные гепатоциты лизировались и фланкирующие праймеры потенциальных нетаргетных сайтов использовались для генерирования ампликона для анализа NGS. Идентификация инсерций/делеций на определенном уровне может подтвердить потенциальный нетаргетный сайт, в то время как выявленное отсутствие инсерций/делеций, на потенциальном нетаргетном сайте, может свидетельствовать о ложном положительном ответе при анализе клеток HEK293_Cas9.

Пример 7. Фенотипический анализ

Анализ секретируемого TTR методом вестерн блоттинга

[259] Линия клеток гепатоцеллюлярной карциномы, HepG2 была трансфицирована, как представлено в Примере 1, с выбранными гидами из Таблицы 1 в трех повторах. Через два дня после трансфекции, один репликат был собран для геномной ДНК и анализа NGS секвенирования для эффективности редактирования. Через пять дней после трансфекции, среда в одном репликате была заменена средой без сыворотки. Через 4 часа среду отбирали для анализа секретируемого TTR методом вестерн блоттинга, как представлено ранее.

Результаты редактирования в процентах для каждого гида и снижение внеклеточного TTR приведены на ФИГ.7.

Анализ внутриклеточного TTR методом вестерн блоттинга

[260] Линия клеток гепатоцеллюлярной карциномы, HUH7 была трансфицирована, как представлено в Примере 1 с *crRNA*, включающими гиды из Таблицы 1. Пулы трансфицированных клеток в культуральной среде пересеивались для дальнейшего анализа. В течение семи дней после трансфекции клетки были собраны и объединенные экстракты клеток (WCE) подготавливались и подвергались анализу методом вестерн блоттинга, как уже говорилось ранее.

[261] WCE анализировались методом вестерн блоттинга для определения уменьшения в молекулярной массе белка TTR. Белок TTR с неизменной структурой характеризуется прогнозируемой молекулярной массой, приблизительно 16 кД. Полоса с такой молекулярной массой выявлялась в контрольных образцах методом вестерн блоттинга.

[262] Процент изменения белка *TTR* рассчитывали используя программное обеспечение Licor Odyssey Image Studio Ver 5.2. GAPDH использовалась как контроль нанесения и одновременного зондирования *TTR*. Отношения рассчитывали по денситометрическим значениям GAPDH для каждого образца и сравнивали с общей площадью полосы *TTR*. Процент снижения белка TTR определяли как нормализованное соотношение относительно полос контрольных образцов. Результаты представлены на ФИГ.8.

Пример 8. Доставка LNP мышам с гуманизированным TTR и мышам с диким типом (wt) (мышинным) TTR.

[263] Мышам, гуманизированным по отношению к гену *TTR*, вводились составы LNP 701-704, содержащие гиды, указанные в Таблице 25 (один состав 5 мышам). Эти мыши, с гуманизированным *TTR* создавались методом генной инженерии следующим образом: область эндогенного локуса мышинного *TTR* удалялась и заменялась ортологичной последовательностью *TTR* человека, локусом, который кодирует белок TTR человека. Для сравнения, 6 мышам с мышинным *TTR* вводился LNP700, содержащий гид (G000282) таргетирующий мышинный *TTR*. Составы LNP с номерами состава 1-5 в Таблице 25 были подготовлены с использованием процедуры Nanoassembly™, как представлено выше, в то время как составы LNP с номерами состава 6-16 готовились по перекрестной методике, представленной выше, но очищались на колонках PD-10 (GE Healthcare Life Sciences) и концентрировались центрифугированием на фильтрах Amicon (Millipore Sigma). В качестве отрицательного контроля мышам соответствующего генотипа вводился только растворитель (буфер Трис - физиологический раствор - сахароза (TSS)). Условия для мышей с гуманизированным *TTR*: вводились составы LNP с номерами состава 2-5 из Таблицы 25, которые содержали 50% 129S6/SvEvTac 50% C57BL/6NTac; условия для мышей с мышинным *TTR*: вводились составы LNP с номерами состава 6-16 из Таблицы 25, в то время как мышам с мышинным *TTR* вводился LNP700, состав №1, который

состоял из 75% C57BL/6NTac 25% 129S6/SvEvTac.

Таблица 25. Составы LNP, которые вводились мышам с гуманизированным *TTR*.

Номер состава	LNP	ГИДЫ	Концентрация РНК (мг/мл)	Отношение N:P	Мольное
					соотношение (липид А, холестерин, DSPC и PEG2k-DMG, соответственно)
1	LNP700	G000282	0.53	4.5	45:44:9:2
2	LNP701	G000481	0.46	4.5	45:44:9:2
3	LNP702	G000489	0.61	4.5	45:44:9:2
4	LNP703	G000494	0.57	4.5	45:44:9:2
5	LNP704	G000499	0.59	4.5	45:44:9:2
6	LNP1148	G000481	0.73	4.5	45:44:9:2
7	LNP1152	G000499	0.45	6.0	50:38:9:3
8	LNP1153	G000482	0.53	6.0	50:38:9:3
9	LNP1155	G000571	0.70	6.0	50:38:9:3
10	LNP1156	G000572	0.58	6.0	50:38:9:3
11	LNP1157	G000480	0.84	6.0	50:38:9:3
12	LNP1159	G000488	0.79	6.0	50:38:9:3
13	LNP1160	G000493	0.71	6.0	50:38:9:3
14	LNP1161	G000500	0.66	6.0	50:38:9:3
15	LNP1162	G000567	0.69	6.0	50:38:9:3
16	LNP1163	G000570	0.66	6.0	50:38:9:3

[264] Составы LNP с номерами состава 1-5, содержали мРНК Cas9 из SEQ ID №:2 и составы LNP с номерами состава 6-16, содержали мРНК Cas9 из SEQ ID №: 1, все в соотношении 1:1 относительно массы гида. LNP содержали липид А, холестерин, DSPC и PEG2k-DMG в мольных соотношениях, которые представлены в Таблице 25, соответственно. Дозировка LNP для составов с номерами 1-5 составляла 2 мг/кг (по общему содержанию РНК) и дозировка LNP в составах номеров 6-16 была 1 мг/кг (по общему содержанию РНК). Результаты редактирования в печени определяли с помощью праймеров, сконструированных для амплификации представляющего интерес домена, при анализе NGS. Результаты редактирования в печени для составов с номерами 1-5, представлены на ФИГ.9, и указывают на редактирование последовательности *TTR* человека каждым из четырех тестируемых гидов на уровне редактирования более 35% (средние значения). Для G000494 и G000499 представлены значения приблизительно 60%. Результаты редактирования в печени для составов с номерами 6-8, 10-13 и 15-16

представлены на ФИГ.13 и в Таблице 26. Продемонстрировано эффективное редактирование последовательности *TTR* человека для каждого из тестируемых составов. Редактирование свыше 38% отмечено для всех составов, несколько составов продемонстрировали показатели редактирования более 60%. Составы 9 и 14 не представлены, вследствие дизайна ампликона ПЦР, результатом этого было низкое количество считываемых последовательностей.

[265] Уровень ТТР человека в сыворотке измерялся у мышей для составов с номерами 6-8, 10-13, и 15-16, смотрите ФИГ.14В. ФИГ.14А является повтором ФИГ.13, предусмотренным с целью сравнения. Нокдаун сывороточного ТТР человека обнаружен для каждого тестируемого состава, результаты тестирования коррелируют с показателями редактирования, обнаруженными в печени (смотрите ФИГ.14А по сравнению с 14В и Таблицу 26).

Таблица 26

Идент-р ГИДА	% редактирования	TTR в сыворотке (%TSS)
TSS (носитель)	0.06	100
G481	61.28	10.52
G499	65.66	8.39
G482	70.86	4.65
G572	73.52	2.11
G480	77.34	3.48
G488	59.125	27.78
G493	38.55	49.73
G567	47.525	44.24
G570	45.5	41.73
G571	33.88	11.39
G500	44.44	34.28

[266] В еще одной серии экспериментов, мышам с гуманизированным TTR вводились составы LNP в последовательных дозировках гидов G000480, G000488, G000489 и G000502. Составы содержали мРНК Cas9 (SEQ ID NO: 1) в соотношении 1:1 относительно массы гида. Составы LNP содержали липид А, холестерин, DSPC и PEG2k-DMG в молярном соотношении 50:38:9:3, соответственно, с коэффициентом N:P 6. Дозировка была на уровне 1,0; 0,3; 0,1, или 0,03 мг/кг (n=5/группа). Составы LNP готовили по методике перекрестного потока, представленной выше, и затем очищали и концентрировали на колонках PD-10 с последующим центрифугированием на фильтрах Амикон, соответственно. Результаты редактирования в печени определяли с помощью праймеров, сконструированных для амплификации представляющего интерес домена, при анализе NGS, и уровни TTR человека в сыворотке были измерены, как представлено выше. Результаты редактирования в печени представлены на ФИГ. 26А, уровни TTR человека в сыворотке на ФИГ. 26В-С. Дозозависимые показатели, как для уровня редактирования, так и для содержания TTR в сыворотке крови были очевидными.

[267] В другой серии экспериментов, мышам с гуманизированным TTR, вводились составы LNP в последовательных дозировках гидов G000481, G000482, G000486 и G000499. Составы содержали мРНК Cas9 (SEQ ID NO: 1) в соотношении 1:1 относительно массы гида. Составы LNP включали липид А, холестерин, DSPC и PEG2k-DMG в молярном соотношении 50:38:9:3, соответственно, с коэффициентом N:P 6. Дозировка была на уровне 1, 0,3 или 0,1 мг/кг (n=5/группа). Составы LNP готовили по методике перекрестного потока, представленной выше, и затем очищали и концентрировали на колонках PD-10 и центрифугировали на фильтрах Амикон, соответственно. Результаты редактирования в печени определяли с помощью праймеров, сконструированных для амплификации представляющего интерес домена для анализа NGS, уровни TTR сыворотки человека определяли, как представлено выше. Результаты редактирования в печени представлены на ФИГ. 27А, уровни TTR сыворотки человека на ФИГ. 27В-С. Дозозависимые показатели, как для уровня редактирования, так и для содержания TTR в сыворотке крови были очевидными.

[268] В другой серии экспериментов, мышам с гуманизированным TTR, вводились составы LNP в последовательных дозировках гидов G000480, G000481, G000486, G000499 и G000502. Составы содержали мРНК Cas9 (SEQ ID NO: 1) в соотношении 1:2 относительно массы гида. Составы LNP содержали липид А, холестерин, DSPC и PEG2k-DMG в молярном соотношении 50:38:9:3, соответственно, с коэффициентом N:P 6. Дозировка была на уровне 1, 0,3 или 0,1 мг/кг (n=5/группа). Составы LNP готовили по методике перекрестного потока, представленной выше, и затем очищали и концентрировали на колонках PD-10 и центрифугировали на фильтрах Амикон, соответственно. Результаты редактирования в печени определяли с помощью праймеров, сконструированных для амплификации представляющего интерес домена, для анализа NGS, и уровни TTR человека в сыворотке измерены, как представлено выше. Результаты редактирования в печени представлены на ФИГ.28А, и уровни TTR человека в сыворотке на ФИГ. 28В-С.

Дозозависимые показатели как для уровня редактирования, так и для содержания TTR в сыворотке крови были очевидными.

[269] В отдельной серии экспериментов, мышам дикого типа CD-1 вводили состав LNP, включающий гид G000502, который имел перекрестную гомологию между мышью и обезьяной и тестировался в дозе, вызывающей отклик. Состав содержал мРНК Cas9 (SEQ ID NO: 1) в соотношении 1:1 относительно массы гида. Состав LNP содержал липид А, холестерин, DSPC и PEG2k-DMG в молярном соотношении 45:44:9:2, соответственно, с коэффициентом N:P 6. Дозировка была на уровне 1, 0,3, 0,1, 0,03, или 0,01 мг/кг (n=5/группа). Результаты редактирования в печени были установлены используя праймеры, предназначенные для расширения области исследования касательно анализа NGS. Результаты редактирования в печени представлены на ФИГ.15А, уровни TTR в сыворотке мыши на ФИГ. 15В. Дозозависимые показатели, как для уровня редактирования, так и для содержания TTR в сыворотке крови были очевидными.

Пример 9. Доставка мышам множественных дозировок LNP

[270] Мышам (самки из лаборатории Чарльз Ривер, в возрасте приблизительно 6-7 недель) вводился состав LNP LNP705, подготовленный с использованием перекрестного потока и методики TFF, как представлено выше, с содержанием G000282 («G282») и мРНК Cas9 (SEQ ID №: 2) в соотношении 1:1 по массе и по общей концентрации РНК 0,5 мг/мл. Соотношение N:P у LNP составило 4,5 а молярное соотношение липида А, холестерина, DSPC и PEG2k-DMG было 45:44:9:2, соответственно.. Состав группам животных вводили один раз в неделю в течение периода времени до одной, двух, трех или четырех недель (QWx1-4), либо один раз в месяц в течение периода времени до двух-трех месяцев (QMx2-3). Дозировка составляла 0,5 мг/кг или 1 мг/кг (по общему содержанию РНК). Контрольные группы получали разовую дозу на 1-й день в концентрации 0,5, 1 или 2 мг/кг. Каждая группа включала по 5 мышей. Содержание TTR в сыворотке анализировали методом ELISA и после некропсии были забраны образцы печени, селезенки и мышц для анализа редактирования с помощью NGS. Группы представлены в Таблице 27. X=вскрытие после некропсии. МРК=мг/кг.

Таблица 27. Исследуемые группы

Группы	Продолжительность /режим дозирования	Доза (мРНК)	Общая введенная доза (мРНК)	Дозир	Дозир	Дозир	Дозир	NX	Дозир	NX
				День1	День8	День15	День22	День28	День43	День49
1	4 недели мультидоза/QWx4	0 (контроль TSS)	0	X	X	X	X	X		
2	2 месяца	1	3	X			X		X	X

3	мульти доза/QMx 3	0,5	1,5	X			X		X	X
4	1 месяц	1	2	X			X	X		
5	мульти доза/ QMx2	0,5	1	X			X	X		
6	4 недели	1	4	X	X	X	X	X		
7	мульти доза/QWx 4	0,5	2	X	X	X	X	X		
8	3 недели	1	3		X	X	X	X		
9	мульти доза/QWx 3	0,5	1,5		X	X	X	X		
10	2 недели	1	2			X	X	X		
11	мульти доза/QWx 2	0,5	1			X	X	X		
12	Разовая доза/ QWx1	1	1				X	X		
13		0,5	0,5				X	X		
14		2	2				День2 6	День3 2		

[271] В Таблице 28 и на ФИГ. 10А-11В представлены результаты уровней TTR в сыворотке (% KD = % нокдауна). В Таблице 29 и на ФИГ. 12 А-С представлены результаты редактирования в печени.

Таблица 28. Результаты TTR в сыворотке.

Временной режим	Доза	TTR в сыворотке (мкг/мл)	TTR в сыворотке (% KD)
QWx4	TSS	1190.7	-
QMx3	0.5	245.01	79.42
QMx2	0.5	776.73	34.77
QWx4	0.5	347.43	70.82

QWx3	0.5	405.70	65.93
QWx2	0.5	432.25	63.70
QWx1	0.5	804.06	32.47
QMx3	1	91.95	92.28
QMx2	1	176.81	85.15
QWx4	1	119.52	89.96
QWx3	1	167.15	85.96
QWx2	1	130.98	89.00
QWx1	1	573.02	51.88
QWx1	2	219.07	81.60

Таблица 29. Результаты редактирования в печени.

Временной режим	Доза	Редактирование в печени (%)
QWx4	TSS	0.38
QMx3	0.5	48.18
QMx2	0.5	36.66
QWx4	0.5	56.03
QWx3	0.5	51.35
QWx2	0.5	34.77
QWx1	0.5	24.16
QMx3	1	63.40
QMx2	1	57.37
QWx4	1	62.89
QWx3	1	59.22
QWx2	1	60.12
QWx1	1	35.16
QWx1	2	60.57

[272] Результаты демонстрируют возможность создания кумулятивного ответа при нескольких дозированиях в течение определенного времени, в том числе через интервал в одну неделю или один месяц для достижения увеличения уровней редактирования TTR и

% KD.

Пример 10. Нагрузка РНК: варьирование отношений мРНК и РНК гида

[273] В этом исследовании оценивалась эффективность в условиях *in vivo* у мышей при различных соотношениях РНК гида к мРНК. CleanCap™, кеппированная мРНК Cas9 с ORF SEQ ID №: 4, HSD 5' UTR, человеческий альбумин 3' UTR, последовательность Kozak и поли- А хвост получены IVT синтезом, как показано в примере 1 с N1-метилпсевдоуридин трифосфатом вместо уридин трифосфата.

[274] Составы LNP сформированы из представленной мРНК и G282 (SEQ ID №: 124), согласно Примеру 1 с липидом А, холестерином, DSPC и PEG2k-DMG в мольном соотношении 50:38:9:3, с коэффициентом N:P 6. Коэффициенты отношения массы составов gRNA: mRNA Cas9 представлены на ФИГ. 19А и 19В.

[275] Для характеристики в условиях *in vivo*, LNP вводились мышам в дозе 0,1 мг относительно содержания общей РНК (мг РНК гида+мг мРНК) на кг (n=5 в группе). Через 7-9 дней после введения, животные были умерщвлены, забраны образцы крови и печени, определялся уровень TTR в сыворотке и редактирование в печени, как представлено в Примере 1. Результаты содержания TTR в сыворотке и редактирования в печени представлены на ФИГ.19А и 19В. В качестве отрицательного контроля мышам вводили буферный раствор TSS. Кроме того, вышеуказанные LNP вводили мышам, в постоянной дозировке мРНК от 0,05 мг/кг (n=5 в группе), в то время как варьирование дозы РНК гида составляло от 0,06 мг/кг до 0,4 мг/кг. Через 7-9 дней после введения, животные были умерщвлены, забраны образцы крови и печени, определен TTR в сыворотке и редактирование в печени. Результаты содержания TTR в сыворотке и редактирования в печени представлены на ФИГ.19С и ФИГ. 19D. Животным с негативным контролем вводился буферный раствор TSS.

Пример 11. Анализ нетаргетной sgRNA TTR в первичных гепатоцитах человека

[276] Анализ нетаргетной sgRNA, таргетирующей TTR, выполнен на первичных гепатоцитах человека (РНН), как представлено в Примере 5, со следующими изменениями. РНН высевались при плотности 33000 клеток на лунку, в покрытые коллагеном 96-луночные планшеты, как представлено в Примере 1. Через двадцать четыре часа после нанесения, клетки промывались средой и трансфицировались с помощью Липофектамина RNAiMAX (ThermoFisher, каталожный номер: 13778150), как представлено в Примере 1. Затем клетки трансфицировались Липоплексом, содержащим 100 нг мРНК Cas9, с последующим быстрым внесением другого состава Липоплекса, содержащего 25 нМ sgRNA и 12,5 нМ донорского олигонуклеотида (0,3 мкл/лунка). Клетки лизировались через 48 часов после трансфекции, экстрагировалась и анализировалась ДНК гида, как далее представлено в Примере 5. Графически результаты представлены на ФИГ. 20.

[277] В Таблице 30 представлено количество нецелевых интегрированных сайтов, обнаруженных в РНН, и оно сравнивается с количеством сайтов, обнаруженных в клетках НекCas9, используемых в Примере 5. Выявлено меньше сайтов в РНН для каждого тестируемого гида по сравнению с клеточной линией НекCas9, без уникальных сайтов,

обнаруженных в одиночных РНН.

Таблица 30. Количество нетаргетных интегрированных сайтов, детектируемых для sgRNA TTR в РНН на основании количественной оценки инсерций олигонуклеотидов

Идент-р ГИДА	Количество сайтов в РНН	Количество сайтов в клетках НекCas9 (Пример 5)
G000480	2	11
G000481	0	3
G000482	2	13
G000483	0	5
G000484	0	7
G000485	3	22
G000486	0	12
G000487	0	14
G000488	0	0
G000489	2	19
G000490	0	12
G000491	7	28
G000492	5	97
G000493	1	7
G000494	0	4
G000495	1	13
G000496	0	1
G000497	3	26
G000498	19	82
G000499	1	4
G000500	12	46
G000501	0	4
G000567	0	9
G000568	11	936
G000570	1	19
G000571	1	16
G000572	2	15

[278] После выявления потенциальных нетаргетных сайтов в РНН с помощью анализа инсерций олигонуклеотида, некоторые потенциальные сайты дополнительно

оценивались с помощью секвенирования таргетного ампликона, например, как представлено в Примере 6. В дополнение к потенциальным нетаргетным сайтам, выявленным в ходе оценки инсерции олигонуклеотидов, в анализ включались дополнительные потенциальные нетаргетные сайты, выявленные при компьютерном прогнозировании.

[279] С этой целью РНН обрабатывались LNP, которые включали 100 нг мРНК Cas9 (SEQ ID №: 1) и, представляющий интерес РНК гид на уровне 14,68 нМ (в соотношении 1:1 по массе), как представлено в Примере 4. LNP готовили с использованием процедуры перекрестного потока, представленной выше, очищали и концентрировали на колонках PD-10 и центрифугировали на фильтрах Амикон, соответственно. LNP формулировали с соотношением N:P 6.0, и они включали липид А, холестерин, DSPC и PEG2k-DMG в молярном соотношении 50:38:9:2, соответственно. После обработки LNP, изолированная геномная ДНК была проанализирована с применением NGS (например, как представлено в Примерах 1 и 6) для обнаружения потенциальных инсерций/делеций на нетаргетном сайте, что указывало бы на события расщепления, опосредованные Cas9. В Таблицах 31 и 32 представлены потенциальные нетаргетные сайты, которые исследованы для gRNA G000480 и G000486, соответственно.

[280] Как показано на ФИГ. 21А-В и 22А-В и в Таблице 33 ниже, инсерции/делеции были обнаружены на низких уровнях только для двух потенциальных нетаргетных сайтов, идентифицированных по количественной оценке инсерций в олигонуклеотиде G000480, и только один для G000486. Не выявлены инсерции/делеции в сайтах при компьютерном моделировании для любого из гидов. Кроме того, на этих сайтах были обнаружены инсерции/делеции только при дозах LNP, близких к насыщению, в то время как показатели инсерций/делеций, выявленные на таргетных сайтах для G000480 и G000486, составляли приблизительно 97% и приблизительно 91%, соответственно (см. Таблицу 33). Геномные координаты этих участков также представлены в Таблицах 31 и 32, и каждый из них соответствует последовательностям, которые не кодируют какой либо белок.

[281] Количественная дозозависимая оценка была затем выполнена для определения самой высокой дозы LNP, при которой не обнаруживались никакие нетаргетные показатели. Первичные гепатоциты человека обрабатывали LNP, которые включали G000480 или G000486, как представлено в Примере 4. Дозы варьировались в пределах 11 точек по концентрации РНК гида (0,001; 0,002; 0,007; 0,02; 0,06; 0,19; 0,57; 1,72 нМ; 5,17; 15,51 нМ и 46,55 нМ). Как представлено штриховой вертикальной линией на ФИГ.21 А-В и 22 А-В, самые высокие концентрации (относительно концентрации РНК гида), при которых потенциальные нетаргетные участки уже не выявляются для G000480 и G000486, составляли 0,57 нМ и 15,51 нМ, соответственно, в то время как, уровень делеций/инсерций на таргетных сайтах в процентах, составил 84,60% и 89,50%, соответственно.

Таблица 31. Идентифицированные потенциальные нетаргетные сайты с помощью детектирования инсерции и компьютерного моделирования для G000480, оцененные посредством секвенирования таргетированного ампликона

Идент-р ГИДА	Идент-р нетаргетного (ОТ) сайта	Используемый метод оценки	Хромосомные координаты (hg38)	Разрыв
G000480	INS-OT.1	Детектирование инсерции	chr7:94767406- 94767426	+
G000480	INS-OT.2	Детектирование инсерции	chr2:192658562- 192658582	+
G000480	INS-OT.3	Детектирование инсерции	chr7:4834390-4834410	+
G000480	INS-OT.4	Детектирование инсерции	chr20:9216118-9216138	-
G000480	INS-OT.5	Детектирование инсерции	chr10:12547071- 12547091	+
G000480	INS-OT.6	Детектирование инсерции	chr6:168377978- 168377998	-
G000480	INS-OT.7	Детектирование инсерции	chr12:114144669- 114144689	-
G000480	INS-OT.8	Детектирование инсерции	chr10:7376755-7376775	+
G000480	INS-OT.9	Детектирование инсерции	chr2:52950299- 52950319	+
G000480	INS-OT.10	Детектирование инсерции	chr8:56579165- 56579185	-
G000480	INS-OT.11	Детектирование инсерции	chr1:189992255- 189992275	+
G000480	PRED-OT.1	Компьютерное моделирование	chr10:12547071- 12547091	+
G000480	PRE-DOT.2	Компьютерное моделирование	chrX:119702782- 119702802	+
G000480	PRED-OT.3	Компьютерное моделирование	chr1:116544586- 116544606	+
G000480	PRED-OT.4	Компьютерное моделирование	chr6:88282884- 88282904	+
G000480	PRED-OT.6	Компьютерное	chr5:121891868-	+

		моделирование	121891888	
G000480	PRED-OT.7	Компьютерное моделирование	chr3:52544945-52544965	+
G000480	PRED-OT.8	Компьютерное моделирование	chr15:36949639-36949659	+
G000480	PRED-OT.9	Компьютерное моделирование	chr5:33866486-33866506	+
G000480	PRED-OT.10	Компьютерное моделирование	chr5:159755754-159755774	+
G000480	PRED-OT.11	Компьютерное моделирование	chr5:31349859-31349879	+
G000480	PRED-OT.12	Компьютерное моделирование	chr11:79485652-79485672	+
G000480	PRED-OT.13	Компьютерное моделирование	chr15:29448864-29448884	+
G000480	PRED-OT.14	Компьютерное моделирование	chr5:171153565-171153585	+
G000480	PRED-OT.15	Компьютерное моделирование	chr9:84855273-84855293	+
G000480	PRED-OT.16	Компьютерное моделирование	chr6:159953060-159953080	+
G000480	PRED-OT.17	Компьютерное моделирование	chr16:51849024-51849044	+
G000480	PRED-OT.18	Компьютерное моделирование	chr3:24108809-24108829	+
G000480	PRED-OT.19	Компьютерное моделирование	chr18:41118310-41118330	+
G000480	PRED-OT.20	Компьютерное моделирование	chr10:108975241-108975261	+
G000480	PRED-OT.21	Компьютерное моделирование	chr1:44683633-44683653	+
G000480	PRED-OT.22	Компьютерное моделирование	chr2:196214849-196214869	+
G000480	PRED-OT.23	Компьютерное моделирование	chr9:117353544-	+

		моделирование	117353564	
G000480	PRED-OT.24	Компьютерное моделирование	chr1:55583322-55583342	+
G000480	PRED-OT.25	Компьютерное моделирование	chr12:28246827-28246847	+
G000480	PRED-OT.26	Компьютерное моделирование	chr4:54545361-54545381	+
G000480	PRED-OT.27	Компьютерное моделирование	chr13:22364836-22364856	+
G000480	PRED-OT.28	Компьютерное моделирование	chr13:80816049-80816069	+
G000480	PRED-OT.29	Компьютерное моделирование	chr7:39078622-39078642	+
G000480	PRED-OT.30	Компьютерное моделирование	chr2:59944386-59944406	+

«INS-OT. №» относится к идентификатору нетаргетного сайта, для выявления инсерции олигонуклеотида, где N является целым числом, указанным выше; «PRED-OT. №» относится к нетаргетному сайту, с моделированным ID, где № является целым числом, указанным выше.

Таблица 32. Идентифицированные потенциальные нетаргетные сайты с помощью детектирования инсерции и компьютерного моделирования для G000486, оцененные посредством секвенирования таргетированного амликона

Идент-р ГИДА	Идент-р нетаргетного (OT) сайта	Используемый метод оценки	Хромосомные координаты (hg38)	Разрыв
G000486	INS-OT.1	Детектирование инсерции	chr14:77332157-77332177	+
G000486	INS-OT.2	Детектирование инсерции	chr14:54672059-54672079	-
G000486	INS-OT.3	Детектирование инсерции	chr4:108513169-108513189	-
G000486	INS-OT.4	Детектирование инсерции	chr5:91397023-91397043	-
G000486	INS-OT.5	Детектирование инсерции	chr9:116626135-116626155	-

G000486	INS-OT.6	Детектирование инсерции	chr6:73201226- 73201246	+
G000486	INS-OT.7	Детектирование инсерции	chr16:89368352- 89368372	-
G000486	INS-OT.8	Детектирование инсерции	chr7:56308371- 56308391	-
G000486	INS-OT.9	Детектирование инсерции	chr21:43605667- 43605687	+
G000486	INS-OT.10	Детектирование инсерции	chr5:26758030- 26758050	+
G000486	INS-OT.11	Детектирование инсерции	chr17:30656428- 30656448	+
G000486	INS-OT.12	Детектирование инсерции	chr8:130486452- 130486472	+
G000486	PRED-OT.1	Компьютерное моделирование	chr11:44707064- 44707084	+
G000486	PRED-OT.2	Компьютерное моделирование	chr5:50775396- 50775416	+
G000486	PRED-OT.3	Компьютерное моделирование	chr4:141623949- 141623969	+
G000486	PRED-OT.4	Компьютерное моделирование	chr1:223481186- 223481206	+
G000486	PRED-OT.5	Компьютерное моделирование	chr6:39951487- 39951507	+
G000486	PRED-OT.6	Компьютерное моделирование	chrY:5456047-5456067	+
G000486	PRED-OT.8	Компьютерное моделирование	chr6:129868719- 129868739	+
G000486	PRED-OT.9	Компьютерное моделирование	chrX:80450312- 80450332	+
G000486	PRED-OT.10	Компьютерное моделирование	chr7:27256771- 27256791	+
G000486	PRED-OT.11	Компьютерное моделирование	chr3:181416528- 181416548	+

G000486	PRED-OT12	Компьютерное моделирование	chr7:146425020-146425040	+
G000486	PRED-OT.13	Компьютерное моделирование	chr3:16980977-16980997	+
G000486	PRED-OT.14	Компьютерное моделирование	chr7:118161002-118161022	+
G000486	PRED-OT.15	Компьютерное моделирование	chr6:102220539-102220559	+
G000486	PRED-OT.16	Компьютерное моделирование	chr12:127278991-127279011	+
G000486	PRED-OT.17	Компьютерное моделирование	chr2:67686631-67686651	+
G000486	PRED-OT.18	Компьютерное моделирование	chr1:114467665-114467685	+
G000486	PRED-OT.19	Компьютерное моделирование	chr3:194514436-194514456	+
G000486	PRED-OT.20	Компьютерное моделирование	chr14:31767581-31767601	+
G000486	PRED-OT.21	Компьютерное моделирование	chr16:28706209-28706229	+
G000486	PRED-OT.22	Компьютерное моделирование	chr8:110526279-110526299	+
G000486	PRED-OT.23	Компьютерное моделирование	chr19:2899814-2899834	+
G000486	PRED-OT.25	Компьютерное моделирование	chr3:130760261-130760281	+
G000486	PRED-OT.26	Компьютерное моделирование	chr11:2506046-2506066	+
G000486	PRED-OT.27	Компьютерное моделирование	chr2:153918318-153918338	+
G000486	PRED-OT.28	Компьютерное моделирование	chr14:40590226-40590246	+
G000486	PRED-OT.29	Компьютерное моделирование	chr18:806650-806670	+

G000486	PRED-OT.30	Компьютерное моделирование	chr2:117707480-117707500	+
---------	------------	----------------------------	--------------------------	---

«INS-OT. №» относится к идентификатору нетаргетного сайта, для выявления инсерций олигонуклеотида, где N является целым числом, указанным выше; «PRED-OT.№» относится к нетаргетному сайту, с моделированным ID, где № является целым числом, указанным выше.

Таблица 33. Детектирование нетаргетных сайтов в РНН, обработанных LNP, которые содержат 100 нг мРНК и 31.03 нМ РНК гида

Идент-р ГИДА	Идент-р нетаргетного (OT) сайта	Характеристика сайта	Частота инсерций/делений (при использовании LNP 100 нг мРНК Cas9 и 14,68 нМ РНК гида)	Стандартное отклонение частоты инсерций/делений
G000480	Не применимо	Нетаргетный	97,33%	1,10%
G000480	INS-OT.2	Нетаргетный	1,43%	0,40%
G000480	INS-OT.4	Нетаргетный	0,97%	0,25%
G000486	Не применимо	Нетаргетный	91,33%	1,97%
G000486	INS-OT.4	Нетаргетный	0,47%	0,06%

Пример 12. Доставка LNP в модели ATTR гуманизированных мышей

[282] В этом примере использована хорошо зарекомендовавшая себя модель наследственного амилоидоза ATTR на гуманизированных трансгенных мышях, у которых экспрессируется патогенная мутантная форма V30M человеческого белка TTR. В этой модели на мышях воспроизводится фенотип накопления TTR в тканях, который наблюдается у пациентов с ATTR, включая периферическую нервную систему и желудочно-кишечный тракт (GI) (Смотрите, Santos et al., Neurobiol Aging. 2010 Feb;31(2):280-9).

[283] Мышам (в возрасте приблизительно 4-5 месяцев) вводились составы LNP, которые готовились с использованием перекрестного потока и методов для TFF, как представлено в Примере 1. Составы LNP формировали с отношением N:P 6,0, они содержали липид А, холестерин, DSPC и PEG2k-DMG в мольном соотношении 50:38:9:2, соответственно. Составы LNP включали мРНК Cas9 (SEQ ID №: 1) и или G000481 («G481») или нетаргетный контрольный гид G000395 («G395»; SEQ ID №: 273), в соотношении gRNA:mRNA 1:1, по массе.

[284] Состав LNP вводили мышам (n=10/группа) через боковую хвостовую вену, как представлено в Примере 1 в одной дозе 1 мг/кг (от общего содержания РНК). На 8 неделю после обработки, мышей подвергали эвтаназии для забора образцов. Уровни белка TTR человека измерялись в сыворотке крови и спинномозговой жидкости (CSF) методом ELISA, как ранее описано Butler et al., Amyloid. 2016 Jun;23(2): 109-18. Ткань печени оценивали на

уровни редактирования, как представлено в Примере 1. Другие ткани (желудок, толстая кишка, седалищный нерв, спинномозговой ганглий (DRG)) отбирались и обрабатывались для полуколичественного иммуногистохимического анализа, как ранее описано Gonsalves et al., *Amyloid*. 2014 Sep; 21(3): 175-184. Статистический анализ результатов иммуногистохимии выполнен с использованием теста Манна-Уитни с p -значением менее 0,0001.

[285] Как показано в ФИГ.23А-В, робастное редактирование (49,4%) TTR наблюдалось в печени гуманизированных мышей после разовой дозы LNP, включающей G481, в контрольной группе редактирования не обнаружено. Анализ событий редактирования показал, что 96,8% событий были инсерциями, а остальные делециями.

[286] Как показано в ФИГ. 24А-В, уровни белка TTR у обработанных мышей снижались в плазме, но не в спинномозговой жидкости (CSF), наблюдалось свыше 99% нокдауна уровней TTR в плазме ($p < 0,001$).

[287] Почти полный нокдаун TTR, наблюдаемый в плазме обработанных животных, коррелирует с клиренсом белка TTR и накоплением амилоидов в анализируемых тканях. Как показано на ФИГ. 25, контрольные мыши продемонстрировали окрашивание амилоидов в тканях, близкое по патофизиологии, отмечаемой в испытаниях у человека с АТТР. Снижение циркулирующего TTR при редактировании локуса *HuTTR V30M* привело к резкому уменьшению осаждения амилоидов в тканях. Приблизительно на 85% или выше снижение окрашивания TTR наблюдалось в обработанных тканях через 8 недель после обработки (ФИГ. 25).

Пример 13. Нокдаун мРНК TTR в первичных гепатоцитах человека (РНН)

[288] В одном эксперименте РНН культивировались и обрабатывались составами LNP, включающими мРНК Cas9 (SEQ ID №: 1) и интересующий РНК гид (смотрите ФИГ. 29, Таблицу 34), как представлено в Примере 4. Составы LNP готовились с использованием процедуры перекрестного потока, представленной выше, очищались, концентрировались с использованием колонок PD-10 и центрифугировались на фильтрах Амикон, соответственно. Составы LNP формулировались с коэффициентом N:P 6,0 и содержали липид А, холестерин, DSPC и PEG2k-DMG в мольном соотношении 50:38:9:2, соответственно. Составы LNP включали: РНК гид : мРНК в соотношении 1:2, а клетки обрабатывались в дозе 300 нг (относительно количества доставленной нагруженной мРНК).

[289] Через девяносто шесть (96) часов после обработки LNP (с тремя биологическими повторами для каждой точки), из клеток РНН выделялась мРНК с помощью кита Dynabeads mRNA DIRECT Kit (ThermoFisher Scientific) в соответствии с протоколом производителя. Выполнялась обратная транскрипция (RT) с помощью обратной транскриптазы Maxima (ThermoFisher Scientific) и поли-дТ-прайма. Полученная кДНК была очищена с помощью микросфер Ampure XP (Agencourt). Для количественной оценки с помощью ПЦР, 2% очищенная кДНК амплифицировалась с Taqman Fast Advanced Mastermix и 3 наборами зондов Taqman, TTR (Assay ID: Hs00174914_m1), GAPDH (Assay ID: Hs02786624_g1) и PPIB (Assay ID: Hs00168719_m1). Исследование выполнено

на установке Quant Studio 7 Flex Real Time PCR System, согласно инструкциям производителя (Life Technologies). Относительную экспрессию мРНК TTR рассчитывали по нормализованному эндогенному контролю (GAPDH и PPIB) по отдельности, а затем результаты усреднялись

[290] Как представлено на ФИГ.29 и в числовых показателях в Таблице 34 ниже, каждый из тестируемых составов LNP вызывал нокдаун мРНК TTR, по сравнению с отрицательным (необработанным) контролем. Группы на ФИГ. 29 и в Таблице 34 идентифицируются по РНК гиду, используемому в каждом составе LNP. Относительная экспрессия мРНК TTR графически представлена на ФИГ. 29, а процент нокдауна мРНК TTR представлен в Таблице 34. **Таблица 34**

Идент-р ГИДА	Нокдаун (средние значения в %)	Стандартное отклонение
G000480	95,19	1,68
G000481	91,39	2,39
G000482	82,31	4,51
G000483	68,78	13,45
G000484	75,22	9,05
G000488	92,77	3,76
G000489	91,85	2,77
G000490	78,34	5,76
G000493	87,53	4,54
G000494	91,15	3,63
G000499	91,38	1,71
G000500	92,90	3,15
G000567	90,89	5,39
G000568	53,44	20,20
G000570	93,38	2,66
G000571	96,17	2,07
G000572	55,92	24,53

[291] В отдельном эксперименте, нокдаун мРНК TTR был оценен после обработки с LNP, которые включали G000480, G000486 и G000502. После формирования LNP, РНН культивировались и обрабатывались каждым из составов LNP, как представлено в эксперименте выше в данном примере, за исключением, что клетки обрабатывались в дозировке 100 нг (по количеству доставленной нагруженной мРНК).

[292] Через девяносто шесть (96) часов после обработки LNP (одна обработка для каждой точки), из клеток РНН выделялась мРНК с помощью кита Dynabeads mRNA DIRECT Kit (ThermoFisher Scientific) в соответствии с протоколом производителя.

Выполнялась обратная транскрипция (RT) с помощью набора High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (ThermoFisher Scientific) согласно инструкциям производителя. Для количественной оценки с помощью ПЦР, 2% очищенная кДНК амплифицировалась с Taqman Fast Advanced Mastermix и 3 Taqman наборами зондов, TTR (Assay ID: Hs00174914_m1), GAPDH (Assay ID: Hs02786624_g1) и PPIB (Assay ID: Hs00168719_m1). Исследование выполнено на установке Quant Studio 7 Flex Real Time PCR System, согласно инструкциям производителя (Life Technologies). Относительную экспрессию мРНК TTR рассчитывали по нормализованному эндогенному контролю (GAPDH и PPIB) по отдельности, а затем результаты усреднялись

[293] Как показано на ФИГ. 30 и представлено в виде числовых значений в Таблице 35 ниже, каждый из протестированных составов LNP вызывал нокдаун мРНК TTR, по сравнению с отрицательным (необработанным) контролем. Для групп на ФИГ. 30 и в Таблице 35, представлены ID РНК гида, используемые в каждом составе LNP. Относительная экспрессия мРНК TTR графически представлена на ФИГ.30, а процент нокдауна мРНК TTR продемонстрирован в Таблице 35.

Таблица 35.

Идент-р ГИДА	Средние показатели нокдауна, в %	Стандартное отклонение
G000480	95,61	0,92
G000486	97,36	0,63
G000502	90,94	2,63

Таблица последовательностей

[294] В следующей Таблице представлен перечень последовательностей, раскрытых в данном документе. Понятно, что если последовательность ДНК (включающая Ts) ссылается на соответствующую РНК, то Ts заменяется на Us (которые могут быть модифицированы или не модифицированы, в зависимости от контекста) и наоборот.

Описание	Последовательность	SEQ ID №
Транскрипт Cas9 вместе с 5' UTR of HSD, соответствующий ORF к SEQ ID NO: 204, последовательность Kozak, и 3' UTR of ALB	GGGTCCCGCAGTCGGCGTCCAGCGGCTCTGCTT GTTCGTGTGTGTGTCGTTGCAGGCCTTATTCGGA TCCGCCACCATGGACAAGAAGTACAGCATCGGA CTGGACATCGGAACAAACAGCGTCGGATGGGC AGTCATCACAGACGAATACAAGGTCCCGAGCAA GAAGTTCAAGGTCCTGGGAAACACAGACAGAC ACAGCATCAAGAAGAACCTGATCGGAGCACTGC TGTTTCGACAGCGGAGAAACAGCAGAAGCAACA AGACTGAAGAGAACAGCAAGAAGAAGATACAC	1

AAGAAGAAAGAACAGAATCTGCTACCTGCAGG
AAATCTTCAGCAACGAAATGGCAAAGGTCGACG
ACAGCTTCTTCCACAGACTGGAAGAAAGCTTCC
TGGTCGAAGAAGACAAGAAGCACGAAAGACAC
CCGATCTTCGGAAACATCGTCGACGAAGTCGCA
TACCACGAAAAGTACCCGACAATCTACCACCTG
AGAAAGAAGCTGGTCGACAGCACAGACAAGGC
AGACCTGAGACTGATCTACCTGGCACTGGCACA
CATGATCAAGTTCAGAGGACACTTCCTGATCGA
AGGAGACCTGAACCCGGACAACAGCGACGTCG
ACAAGCTGTTTCATCCAGCTGGTCCAGACATA
ACCAGCTGTTTCGAAGAAAACCCGATCAACGCAA
GCGGAGTCGACGCAAAGGCAATCCTGAGCGCA
AGACTGAGCAAGAGCAGAAGACTGGAAAACCT
GATCGCACAGCTGCCGGGAGAAAAGAAGAACG
GACTGTTCGGAAACCTGATCGCACTGAGCCTGG
GACTGACACCGAACTTCAAGAGCAACTTCGACC
TGGCAGAAGACGCAAAGCTGCAGCTGAGCAAG
GACACATACGACGACGACCTGGACAACCTGCTG
GCACAGATCGGAGACCAGTACGCAGACCTGTTC
CTGGCAGCAAAGAACCTGAGCGACGCAATCCTG
CTGAGCGACATCCTGAGAGTCAACACAGAAATC
ACAAAGGCACCGCTGAGCGCAAGCATGATCAA
GAGATACGACGAACACCACCAGGACCTGACACT
GCTGAAGGCACTGGTCAGACAGCAGCTGCCGGA
AAAGTACAAGGAAATCTTCTTCGACCAGAGCAA
GAACGGATACGCAGGATACATCGACGGAGGAG
CAAGCCAGGAAGAATTCTACAAGTTCATCAAGC
CGATCCTGGAAAAGATGGACGGAACAGAAGAA
CTGCTGGTCAAGCTGAACAGAGAAGACCTGCTG
AGAAAGCAGAGAACATTCGACAACGGAAGCAT
CCCGCACCAAGATCCACCTGGGAGAAGTGCACGC
AATCCTGAGAAGACAGGAAGACTTCTACCCGTT
CCTGAAGGACAACAGAGAAAAGATCGAAAAGA
TCCTGACATTCAGAATCCCGTACTACGTCGGAC

CGCTGGCAAGAGGAAACAGCAGATTCGCATGG
ATGACAAGAAAGAGCGAAGAAACAATCACACC
GTGGAACTTCGAAGAAGTCGTCGACAAGGGAG
CAAGCGCACAGAGCTTCATCGAAAGAATGACA
AACTTCGACAAGAACCTGCCGAACGAAAAGGTC
CTGCCGAAGCACAGCCTGCTGTACGAATACTTC
ACAGTCTACAACGAACTGACAAAGGTCAAGTAC
GTCACAGAAGGAATGAGAAAGCCGGCATTCTTG
AGCGGAGAACAGAAGAAGGCAATCGTCGACCT
GCTGTTCAAGACAAACAGAAAGGTCACAGTCAA
GCAGCTGAAGGAAGACTACTTCAAGAAGATCG
AATGCTTCGACAGCGTCGAAATCAGCGGAGTCG
AAGACAGATTCAACGCAAGCCTGGGAACATACC
ACGACCTGCTGAAGATCATCAAGGACAAGGACT
TCCTGGACAACGAAGAAAACGAAGACATCCTG
GAAGACATCGTCCTGACACTGACACTGTTCGAA
GACAGAGAAATGATCGAAGAAAGACTGAAGAC
ATACGCACACCTGTTCGACGACAAGGTCATGAA
GCAGCTGAAGAGAAGAAGATACACAGGATGGG
GAAGACTGAGCAGAAAGCTGATCAACGGAATC
AGAGACAAGCAGAGCGGAAAGACAATCCTGGA
CTTCCTGAAGAGCGACGGATTCGCAAACAGAAA
CTTCATGCAGCTGATCCACGACGACAGCCTGAC
ATTCAAGGAAGACATCCAGAAGGCACAGGTCA
GCGGACAGGGAGACAGCCTGCACGAACACATC
GCAAACCTGGCAGGAAGCCCGGCAATCAAGAA
GGGAATCCTGCAGACAGTCAAGGTCGTCGACGA
ACTGGTCAAGGTCATGGGAAGACACAAGCCGG
AAAACATCGTCATCGAAATGGCAAGAGAAAAC
CAGACAACACAGAAGGGACAGAAGAACAGCAG
AGAAAGAATGAAGAGAATCGAAGAAGGAATCA
AGGAACTGGGAAGCCAGATCCTGAAGGAACAC
CCGGTCGAAAACACACAGCTGCAGAACGAAAA
GCTGTACCTGTACTACCTGCAGAACGGAAGAGA
CATGTACGTCGACCAGGAACTGGACATCAACAG

ACTGAGCGACTACGACGTCGACCACATCGTCCC
GCAGAGCTTCCTGAAGGACGACAGCATCGACAA
CAAGGTCCTGACAAGAAGCGACAAGAACAGAG
GAAAGAGCGACAACGTCCCGAGCGAAGAAGTC
GTCAAGAAGATGAAGAACTACTGGAGACAGCT
GCTGAACGCAAAGCTGATCACACAGAGAAAGTT
CGACAACCTGACAAAGGCAGAGAGAGGAGGAC
TGAGCGAACTGGACAAGGCAGGATTCATCAAG
AGACAGCTGGTCGAAACAAGACAGATCACAAA
GCACGTCGCACAGATCCTGGACAGCAGAATGAA
CACAAAGTACGACGAAAACGACAAGCTGATCA
GAGAAGTCAAGGTCATCACACTGAAGAGCAAG
CTGGTCAGCGACTTCAGAAAGGACTTCCAGTTC
TACAAGGTCAGAGAAATCAACAACCTACCACCAC
GCACACGACGCATACCTGAACGCAGTCGTCGGA
ACAGCACTGATCAAGAAGTACCCGAAGCTGGA
AAGCGAATTCGTCTACGGAGACTACAAGGTCTA
CGACGTCAGAAAGATGATCGCAAAGAGCGAAC
AGGAAATCGGAAAGGCAACAGCAAAGTACTTC
TTCTACAGCAACATCATGAACTTCTTCAAGACA
GAAATCACACTGGCAAACGGAGAAATCAGAAA
GAGACCGCTGATCGAAACAAACGGAGAAACAG
GAGAAATCGTCTGGGACAAGGGAAGAGACTTC
GCAACAGTCAGAAAGGTCCTGAGCATGCCGCAG
GTCAACATCGTCAAGAAGACAGAAGTCCAGAC
AGGAGGATTCAGCAAGGAAAGCATCCTGCCGA
AGAGAAACAGCGACAAGCTGATCGCAAGAAAG
AAGGACTGGGACCCGAAGAAGTACGGAGGATT
CGACAGCCCGACAGTCGCATACAGCGTCCTGGT
CGTCGCAAAGGTCGAAAAGGGAAAGAGCAAGA
AGCTGAAGAGCGTCAAGGAACTGCTGGGAATC
ACAATCATGGAAAGAAGCAGCTTCGAAAAGAA
CCCGATCGACTTCTGGAAGCAAAGGGATACAA
GGAAGTCAAGAAGGACCTGATCATCAAGCTGCC
GAAGTACAGCCTGTTCGAACTGGAAAACGGAA

	<p>GAAAGAGAATGCTGGCAAGCGCAGGAGAACTG CAGAAGGGAAACGAACTGGCACTGCCGAGCAA GTACGTCAACTTCTGTACCTGGCAAGCCACTA CGAAAAGCTGAAGGGAAGCCCGGAAGACAACG AACAGAAGCAGCTGTTCGTCGAACAGCACAAGC ACTACCTGGACGAAATCATCGAACAGATCAGCG AATTCAGCAAGAGAGTCATCCTGGCAGACGCAA ACCTGGACAAGGTCCTGAGCGCATAACAAGC ACAGAGACAAGCCGATCAGAGAACAGGCAGAA AACATCATCCACCTGTTCACTGACAAACCTG GGAGCACCGGCAGCATTCAAGTACTTCGACACA ACAATCGACAGAAAGAGATACACAAGCACAAA GGAAGTCCTGGACGCAAACTGATCCACCAGAG CATCACAGGACTGTACGAAACAAGAATCGACCT GAGCCAGCTGGGAGGAGACGGAGGAGGAAGCC CGAAGAAGAAGAGAAAGGTCTAGCTAGCCATC ACATTTAAAAGCATCTCAGCCTACCATGAGAAT AAGAGAAAGAAAATGAAGATCAATAGCTTATTC ATCTCTTTTTCTTTTTCTGTTGGTGTAAGCCAAC ACCCTGTCTAAAAAACATAAATTTCTTTAATCAT TTTGCCTCTTTTCTCTGTGCTTCAATTAATAAAA AATGGAAAGAACCTCGAG</p>	
<p>Транскрипт Cas 9, включающий Cas 9 ORF, соответствующий SEQ ID №: 205 с использованием кодонов, как правило, характеризующихся высокой экспрессией у человека</p>	<p>GGGTCCCGCAGTCGGCGTCCAGCGGCTCTGCTT GTTCGTGTGTGTGTCGTTGCAGGCCTTATTCGGA TCCATGCCTAAGAAAAAGCGGAAGGTCGACGG GGATAAGAAGTACTCAATCGGGCTGGATATCGG AACTAATTCCGTGGGTTGGGCAGTGATCACGGA TGAATACAAAGTGCCGTCCAAGAAGTTCAAGGT CCTGGGGAACACCGATAGACACAGCATCAAGA AAAATCTCATCGGAGCCCTGCTGTTTGACTCCG GCGAAACCGCAGAAGCGACCCGGCTCAAACGT ACCGCGAGGGCGACGCTACACCCGGCGGAAGAA TCGCATCTGCTATCTGCAAGAGATCTTTTCGAAC GAAATGGCAAAGGTCGACGACAGCTTCTTCCAC CGCCTGGAAGAATCTTCTGCTGGTGGAGGAGGAC</p>	<p>2</p>

AAGAAGCATGAACGGCATCCTATCTTTGGAAAC
ATCGTCGACGAAGTGGCGTACCACGAAAAGTAC
CCGACCATCTACCATCTGCGGAAGAAGTTGGTT
GACTCAACTGACAAGGCCGACCTCAGATTGATC
TACTTGGCCCTCGCCCATATGATCAAATTCCGCG
GACACTTCCTGATCGAAGGCGATCTGAACCCTG
ATAACTCCGACGTGGATAAGCTTTTCATTCAACT
GGTGCAGACCTACAACCAACTGTTCTGAAGAAA
CCCAATCAATGCTAGCGGCGTCGATGCCAAGGC
CATCCTGTCCGCCCGGCTGTCGAAGTCGCGGCG
CCTCGAAAACCTGATCGCACAGCTGCCGGGAGA
GAAAAGAACGGACTTTTCGGCAACTTGATCGC
TCTCTCACTGGGACTCACTCCCAATTTCAAGTCC
AATTTTGACCTGGCCGAGGACGCGAAGCTGCAA
CTCTCAAAGGACACCTACGACGACGACTTGGAC
AATTTGCTGGCACAAATTGGCGATCAGTACGCG
GATCTGTTCTTGCCGCTAAGAACCTTTCGGACG
CAATCTTGCTGTCCGATATCCTGCGCGTGAACA
CCGAAATAACCAAAGCGCCGCTTAGCGCCTCGA
TGATTAAGCGGTACGACGAGCATCACCAGGATC
TCACGCTGCTCAAAGCGCTCGTGAGACAGCAAC
TGCCTGAAAAGTACAAGGAGATCTTCTTCGACC
AGTCCAAGAATGGGTACGCAGGGTACATCGATG
GAGGCGCTAGCCAGGAAGAGTTCTATAAGTTCA
TCAAGCCAATCCTGGAAAAGATGGACGGAACC
GAAGAACTGCTGGTCAAGCTGAACAGGGAGGA
TCTGCTCCGAAACAGAGAACCTTTGACAACGG
ATCCATTCCCCACCAGATCCATCTGGGTGAGCT
GCACGCCATCTTGCGGCGCCAGGAGGACTTTTA
CCCATTCTCAAGGACAACCGGGAAAAGATCGA
GAAAATTCTGACGTTCCGCATCCCGTATTACGT
GGGCCCACTGGCGCGCGGCAATTCGCGCTTCGC
GTGGATGACTAGAAAATCAGAGGAAACCATCA
CTCCTTGGAATTTTCGAGGAAGTTGTGGATAAGG
GAGCTTCGGCACAAAGCTTCATCGAACGAATGA

CCAACTTCGACAAGAATCTCCCAAACGAGAAGG
TGCTTCCTAAGCACAGCCTCCTTTACGAATACTT
CACTGTCTACAACGAACTGACTAAAGTGAAATA
CGTTACTGAAGGAATGAGGAAGCCGGCCTTTCT
GTCCGGAGAACAGAAGAAAGCAATTGTCGATCT
GCTGTTCAAGACCAACCGCAAGGTGACCGTCAA
GCAGCTTAAAGAGGACTACTTCAAGAAGATCGA
GTGTTTCGACTCAGTGGAATCAGCGGGGTGGA
GGACAGATTCAACGCTTCGCTGGGAACCTATCA
TGATCTCCTGAAGATCATCAAGGACAAGGACTT
CCTTGACAACGAGGAGAACGAGGACATCCTGG
AAGATATCGTCCTGACCTTGACCCTTTTCGAGG
ATCGCGAGATGATCGAGGAGAGGCTTAAGACCT
ACGCTCATCTCTTCGACGATAAGGTCATGAAAC
AACTCAAGCGCCCGCGGTACACTGGTTGGGGCC
GCCTCTCCCGCAAGCTGATCAACGGTATTCGCG
ATAAACAGAGCGGTAAAACCTATCCTGGATTTC
TCAAATCGGATGGCTTCGCTAATCGTAACTTCAT
GCAATTGATCCACGACGACAGCCTGACCTTAA
GGAGGACATCCAAAAGCACAAAGTGTCCGGAC
AGGGAGACTCACTCCATGAACACATCGCGAATC
TGGCCGGTTCGCCGGCGATTAAGAAGGGAATTC
TGCAA ACTGTGAAGGTGGTCGACGAGCTGGTGA
AGGTCATGGGACGGCACAACCGGAGAATATC
GTGATTGAAATGGCCCGAGAAAACCAGACTACC
CAGAAGGGCCAGAAAACTCCCGCGAAAGGAT
GAAGCGGATCGAAGAAGGAATCAAGGAGCTGG
GCAGCCAGATCCTGAAAGAGCACCCGGTGGAA
AACACGCAGCTGCAGAACGAGAAGCTCTACCTG
TACTATTTGCAAAATGGACGGGACATGTACGTG
GACCAAGAGCTGGACATCAATCGGTTGTCTGAT
TACGACGTGGACCACATCGTTCCACAGTCCTTTC
TGAAGGATGACTCGATCGATAACAAGGTGTTGA
CTCGCAGCGACAAGAACAGAGGGAAGTCAGAT
AATGTGCCATCGGAGGAGGTCGTGAAGAAGAT

GAAGAATTACTGGCGGCAGCTCCTGAATGCGAA
GCTGATTACCCAGAGAAAGTTTGACAATCTCAC
TAAAGCCGAGCGCGGCGGACTCTCAGAGCTGGA
TAAGGCTGGATTCATCAAACGGCAGCTGGTCTGA
GACTCGGCAGATTACCAAGCACGTGGCGCAGAT
CTTGGACTCCCGCATGAACACTAAATACGACGA
GAACGATAAGCTCATCCGGGAAGTGAAGGTGAT
TACCCTGAAAAGCAAACCTTGTGTCTGGACTTTCG
GAAGGACTTTCAGTTTTACAAAGTGAGAGAAAT
CAACAACCTACCATCACGCGCATGACGCATACCT
CAACGCTGTGGTCTGGTACCGCCCTGATCAAAA
GTACCCTAAACTTGAATCGGAGTTTGTGTACGG
AGACTACAAGGTCTACGACGTGAGGAAGATGAT
AGCCAAGTCCGAACAGGAAATCGGGAAAGCAA
CTGCGAAATACTTCTTTTACTCAAACATCATGAA
CTTTTTCAAGACTGAAATTACGCTGGCCAATGG
AGAAATCAGGAAGAGGCCACTGATCGAAACTA
ACGGAGAAACGGGCGAAATCGTGTGGGACAAG
GGCAGGGACTTCGCAACTGTTCGCAAAGTGCTC
TCTATGCCGCAAGTCAATATTGTGAAGAAAACC
GAAGTGCAAACCGGCGGATTTTCAAAGGAATCG
ATCCTCCCAAAGAGAAATAGCGACAAGCTCATT
GCACGCAAGAAAGACTGGGACCCGAAGAAGTA
CGGAGGATTCGATTCGCCGACTGTCTGCATACTC
CGTCCTCGTGGTGGCCAAGGTGGAGAAGGGAA
AGAGCAAAAAGCTCAAATCCGTCAAAGAGCTG
CTGGGGATTACCATCATGGAACGATCCTCGTTC
GAGAAGAACCCGATTGATTTCTCGAGGCGAAG
GGTTACAAGGAGGTGAAGAAGGATCTGATCATC
AAACTCCCCAAGTACTCACTGTTCGAACTGGAA
AATGGTCGGAAGCGCATGCTGGCTTCGGCCGGA
GAACTCCAAAAGGAAATGAGCTGGCCTTGCCCT
AGCAAGTACGTCAACTTCCTCTATCTTGCTTCGC
ACTACGAAAACTCAAAGGGTCACCGGAAGAT
AACGAACAGAAGCAGCTTTTCGTGGAGCAGCAC

		<p>AAGCATTATCTGGATGAAATCATCGAACAAATC TCCGAGTTTTCAAAGCGCGTGATCCTCGCCGAC GCCAACCTCGACAAAGTCCTGTCGGCCTACAAT AAGCATAGAGATAAGCCGATCAGAGAACAGGC CGAGAACATTATCCACTTGTTCCACCCTGACTAA CCTGGGAGCCCCAGCCGCCTTCAAGTACTTCGA ТАCTACTATCGATCGCAAAAGATACACGTCCAC CAAGGAAGTTCTGGACGCGACCCTGATCCACCA AAGCATCACTGGACTCTACGAAACTAGGATCGA TCTGTCGCAGCTGGGTGGCGATTGATAGTCTAG CCATCACATTTAAAAGCATCTCAGCCTACCATG AGAATAAGAGAAAGAAAATGAAGATCAATAGC TTATTCATCTCTTTTTCTTTTTTCGTTGGTGTAAG CCAACACCCTGTCTAAAAAACATAAATTTCTTT AATCATTTTGCCTCTTTTCTCTGTGCTTCAATTA ATAAAAAATGGAAAGAACCTCGAG</p>	
Модифицированная последовательность sgRNA («N» может быть любым естественным или синтетическим нуклеотидом)		<p>mN*mN*mN*NNNNNNNNNNNNNNNNNNNGUUUUA GAmGmCmUmAmGmAmAmUmAmGmCAAGU UAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUm UmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCm GmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU</p>	3
30/30/39 поли-А последовательность		<p>AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAG CGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA ACCGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAAAA</p>	4
CR003335 gRNA таргетная к TTR человека (экзон 1)		CUGCUCUCCUCUGCCUUGC	5
CR003336 gRNA таргетная к TTR человека (экзон 1)		CCUCCUCUGCCUUGCUGGAC	6
CR003337 gRNA таргетная к TTR		CCAGUCCAGCAAGGCAGAGG	7

человека (экзон 1)		
CR003338 таргетная к человеку (экзон 1)	gRNA TTR AUACCAGUCCAGCAAGGCAG	8
CR003339 таргетная к человеку (экзон 1)	gRNA TTR ACACAAAUACCAGUCCAGCA	9
CR003340 таргетная к человеку (экзон 1)	gRNA TTR UGGACUGGUAUUUGUGUCUG	10
CR003341 таргетная к человеку (экзон 1)	gRNA TTR CUGGUAUUUGUGUCUGAGGC	11
CR003342 таргетная к человеку (экзон 2)	gRNA TTR CUUCUCUACACCCAGGGCAC	12
CR003343 таргетная к человеку (экзон 2)	gRNA TTR CAGAGGACACUUGGAUUCAC	13
CR003344 таргетная к человеку (экзон 2)	gRNA TTR UUUGACCAUCAGAGGACACU	14
CR003345 таргетная к человеку (экзон 2)	gRNA TTR UCUAGAACUUUGACCAUCAG	15
CR003346 таргетная к человеку (экзон 2)	gRNA TTR AAAGUUCUAGAUGCUGUCCG	16
CR003347 таргетная к человеку (экзон 2)	gRNA TTR CAUUGAUGGCAGGACUGCCU	17
CR003348 таргетная к человеку (экзон 2)	gRNA TTR AGGCAGUCCUGCCAUCA AUG	18
CR003349	gRNA UGCACGGCCACAUUGAUGGC	19

таргетная к TTR человека (экзон 2)		
CR003350 gRNA таргетная к TTR человека (экзон 2)	CACAUGCACGGCCACAUUGA	20
CR003351 gRNA таргетная к TTR человека (экзон 2)	AGCCUUUCUGAACACAUGCA	21
CR003352 gRNA таргетная к TTR человека (экзон 2)	GAAAGGCUGCUGAUGACACC	22
CR003353 gRNA таргетная к TTR человека (экзон 2)	AAAGGCUGCUGAUGACACCU	23
CR003354 gRNA таргетная к TTR человека (экзон 2)	ACCUGGGAGCCAUUUGCCUC	24
CR003355 gRNA таргетная к TTR человека (экзон 2)	CCCAGAGGCAA AUGGCUCCC	25
CR003356 gRNA таргетная к TTR человека (экзон 2)	GCAACUUACCCAGAGGCAAA	26
CR003357 gRNA таргетная к TTR человека (экзон 2)	UUCUUUGGCAACUUACCCAG	27
CR003358 gRNA таргетная к TTR человека (экзон 3)	AUGCAGCUCUCCAGACUCAC	28
CR003359 gRNA таргетная к TTR человека (экзон 3)	AGUGAGUCUGGAGAGCUGCA	29
CR003360 gRNA таргетная к TTR человека (экзон 3)	GUGAGUCUGGAGAGCUGCAU	30

CR003361	gRNA			
таргетная	к	TTR	GCUGCAUGGGCUCACAACUG	31
человека (экзон 3)				
CR003362	gRNA			
таргетная	к	TTR	GCAUGGGCUCACAACUGAGG	32
человека (экзон 3)				
CR003363	gRNA			
таргетная	к	TTR	ACUGAGGAGGAAUUUGUAGA	33
человека (экзон 3)				
CR003364	gRNA			
таргетная	к	TTR	CUGAGGAGGAAUUUGUAGAA	34
человека (экзон 3)				
CR003365	gRNA			
таргетная	к	TTR	UGUAGAAGGGAUUAUACAAAG	35
человека (экзон 3)				
CR003366	gRNA			
таргетная	к	TTR	AAAUAGACACCAAUCUUAC	36
человека (экзон 3)				
CR003367	gRNA			
таргетная	к	TTR	AGACACCAAUCUUACUGGA	37
человека (экзон 3)				
CR003368	gRNA			
таргетная	к	TTR	AAGUGCCUCCAGUAAGAUU	38
человека (экзон 3)				
CR003369	gRNA			
таргетная	к	TTR	CUCUGCAUGCUCUAUGGAAUG	39
человека (экзон 3)				
CR003370	gRNA			
таргетная	к	TTR	CCUCUGCAUGCUCUAUGGAAU	40
человека (экзон 3)				
CR003371	gRNA			
таргетная	к	TTR	ACCUCUGCAUGCUCUAUGGAA	41
человека (экзон 3)				
CR003372	gRNA			
таргетная	к	TTR	UACUCACCUCUGCAUGCUCU	42

человека (экзон 3)		
CR003373 таргетная к человеку (экзон 4)	gRNA TTR GUAUUCACAGCCAACGACUC	43
CR003374 таргетная к человеку (экзон 4)	gRNA TTR GCGGCGGGGGCCGGAGUCGU	44
CR003375 таргетная к человеку (экзон 4)	gRNA TTR AAUGGUGUAGCGGCGGGGGC	45
CR003376 таргетная к человеку (экзон 4)	gRNA TTR CGGCAAUGGUGUAGCGGCGG	46
CR003377 таргетная к человеку (экзон 4)	gRNA TTR GCGGCAAUGGUGUAGCGGCG	47
CR003378 таргетная к человеку (экзон 4)	gRNA TTR GGCGGCAAUGGUGUAGCGGC	48
CR003379 таргетная к человеку (экзон 4)	gRNA TTR GGGCGGCAAUGGUGUAGCGG	49
CR003380 таргетная к человеку (экзон 4)	gRNA TTR GCAGGGCGGCAAUGGUGUAG	50
CR003381 таргетная к человеку (экзон 4)	gRNA TTR GGGGCUCAGCAGGGCGGCAA	51
CR003382 таргетная к человеку (экзон 4)	gRNA TTR GGAGUAGGGGCUCAGCAGGG	52
CR003383 таргетная к человеку (экзон 4)	gRNA TTR AUAGGAGUAGGGGCUCAGCA	53
CR003384 таргетная к человеку (экзон 4)	gRNA TTR AAUAGGAGUAGGGGCUCAGC	54

таргетная к TTR человека (экзон 4)		
CR003385 gRNA таргетная к TTR человека (экзон 4)	CCCCUACUCCUAUCCACCA	55
CR003386 gRNA таргетная к TTR человека (экзон 4)	CCGUGGUGGAAUAGGAGUAG	56
CR003387 gRNA таргетная к TTR человека (экзон 4)	GCCGUGGUGGAAUAGGAGUA	57
CR003388 gRNA таргетная к TTR человека (экзон 4)	GACGACAGCCGUGGUGGAAU	58
CR003389 gRNA таргетная к TTR человека (экзон 4)	AUUGGUGACGACAGCCGUGG	59
CR003390 gRNA таргетная к TTR человека (экзон 4)	GGGAUUGGUGACGACAGCCG	60
CR003391 gRNA таргетная к TTR человека (экзон 4)	GGCUGUCGUCACCAAUCCCA	61
CR003392 gRNA таргетная к TTR человека (экзон 4)	AGUCCCUCAUCCUUGGGAU	62
CR005298 gRNA таргетная к TTR человека (экзон 1)	UCCACUCAUUCUUGGCAGGA	63
CR005299 gRNA таргетная к TTR человека (экзон 4)	AGCCGUGGUGGAAUAGGAGU	64
CR005300 gRNA таргетная к TTR человека (экзон 1)	UCACAGAAACACUCACCGUA	65

CR005301	gRNA			
таргетная	к	TTR	GUCACAGAAACACUCACCGU	66
человека (экзон 1)				
CR005302	gRNA			
таргетная	к	TTR	ACGUGUCUUCUCUACACCCA	67
человека (экзон 2)				
CR005303	gRNA			
таргетная	к	TTR	UGAAUCCAAGUGUCCUCUGA	68
человека (экзон 2)				
CR005304	gRNA			
таргетная	к	TTR	GGCCGUGCAUGUGUUCAGAA	69
человека (экзон 2)				
CR005305	gRNA			
таргетная	к	TTR	UAUAGGAAAACCAGUGAGUC	70
человека (экзон 3)				
CR005306	gRNA			
таргетная	к	TTR	AAAUCUACUGGAAGGCACU	71
человека (экзон 3)				
CR005307	gRNA			
таргетная	к	TTR	UGUCUGUCUUCUCUCAUAGG	72
человека (экзон 4)				
CR000689	gRNA			
таргетная	к	TTR	ACACAAAUACCAGUCCAGCG	73
обезьяны				
CR005364	gRNA			
таргетная	к	TTR	AAAGGCUGCUGAUGAGACCU	74
обезьяны				
CR005365	gRNA			
таргетная	к	TTR	CAUUGACAGCAGGACUGCCU	75
обезьяны				
CR005366	gRNA			
таргетная	к	TTR	AUACCAGUCCAGCGAGGCAG	76
обезьяны				
CR005367	gRNA			
таргетная	к	TTR	CCAGUCCAGCGAGGCAGAGG	77

обезьяны			
CR005368 таргетная обезьяны	gRNA к TTR	CCUCCUCUGCCUCGCUGGAC	78
CR005369 таргетная обезьяны	gRNA к TTR	AAAGUUCUAGAUGCCGUCCG	79
CR005370 таргетная обезьяны	gRNA к TTR	ACUUGUCUUCUCUAUACCCA	80
CR005371 таргетная обезьяны	gRNA к TTR	AAGUGACUUCCAGUAAGAUU	81
CR005372 таргетная обезьяны	gRNA к TTR	AAAAGGCUGCUGAUGAGACC	82
		Не используется	83
		Не используется	84
		Не используется	85
		Не используется	86
G000480 модифицированная последовательность sgRNA, таргетная к человека	sgRNA к TTR	mA*mA*mA*GGCUGCUGAUGACACCUGUUUA GAmGmCmUmAmGmAmAmUmAmGmCAAGU UAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUm UmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCm GmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	87
G000481 модифицированная последовательность sgRNA, таргетная к человека	sgRNA к TTR	mU*mC*mU*AGAACUUUGACCAUCAGGUUUUA GAmGmCmUmAmGmAmAmUmAmGmCAAGU UAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUm UmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCm GmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	88
G000482 модифицированная последовательность sgRNA, таргетная к человека	sgRNA к TTR	mU*mG*mU*AGAAGGGAUAUACAAAGGUUUUA GAmGmCmUmAmGmAmAmUmAmGmCAAGU UAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUm UmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCm GmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	89

G000483	sgRNA	mU*mC*mC*ACUCAUUCUUGGCAGGAGUUUUA GAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGU UAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUm UmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCm GmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	90
G000484	sgRNA	mA*mG*mA*CACCAAUCUACUGGAGUUUUA GAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGU UAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUm UmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCm GmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	91
G000485	sgRNA	mC*mC*mU*CCUCUGCCUUGCUGGACGUUUUAG AmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUU AAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmU mGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmG mAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	92
G000486	sgRNA	mA*mC*mA*CAAUACCAGUCCAGCAGUUUUA GAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGU UAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUm UmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCm GmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	93
G000487	sgRNA	mU*mU*mC*UUUGGCAACUACCCAGGUUUUA GAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGU UAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUm UmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCm GmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	94
G000488	sgRNA	mA*mA*mA*GUUCUAGAUGCUGUCCGUUUUA GAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGU UAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUm UmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCm GmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	95
G000489	sgRNA	mU*mU*mU*GACCAUCAGAGGACACUGUUUUA GAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGU UAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUm UmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCm GmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	96

G000490	sgRNA	mA*mA*mA*UAGACACCAAUCUUACGUUUUA GAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGU UAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUm UmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCm GmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	97
G000491	sgRNA	mA*mU*mA*CCAGUCCAGCAAGGCAGGUUUUA GAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGU UAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUm UmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCm GmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	98
G000492	sgRNA	mC*mU*mU*CUCUACACCCAGGGCACGUUUUAG AmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUU AAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmU mGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmG mAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	99
G000493	sgRNA	mA*mA*mG*UGCCUCCAGUAAGAUUGUUUUUA GAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGU UAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUm UmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCm GmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	100
G000494	sgRNA	mG*mU*mG*AGUCUGGAGAGCUGCAUGUUUUUA GAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGU UAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUm UmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCm GmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	101
G000495	sgRNA	mC*mA*mG*AGGACACUUGGAUUCACGUUUUA GAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGU UAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUm UmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCm GmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	102
G000496	sgRNA	mG*mG*mC*CGUGCAUGUGUUCAGAAGUUUUUA GAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGU UAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUm UmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCm GmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	103

G000497	sgRNA	mC*mU*mG*CUCCUCCUCUGCCUUGCGUUUUAG AmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUU AAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmU mGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmG mAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	104
G000498	sgRNA	mA*mG*mU*GAGUCUGGAGAGCUGCAGUUUUA GAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGU UAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUm UmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCm GmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	105
G000499	sgRNA	mU*mG*mA*AUCCAAGUGUCCUCUGAGUUUUA GAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGU UAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUm UmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCm GmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	106
G000500	sgRNA	mC*mC*mA*GUCCAGCAAGGCAGAGGGUUUUA GAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGU UAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUm UmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCm GmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	107
G000501	sgRNA	mU*mC*mA*CAGAAACACUCACCGUAGUUUUA GAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGU UAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUm UmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCm GmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	108
G000567	sgRNA	mG*mA*mA*AGGCUGCUGAUGACACCGUUUUA GAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGU UAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUm UmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCm GmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	109
G000568	sgRNA	mG*mG*mC*UGUCGUCACCAAUCCCAGUUUUAG AmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUU AAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmU mGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmG mAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	110

G000570	sgRNA	mC*mA*mU*UGAUGGCAGGACUGCCUGUUUUA GAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGU UAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUm UmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCm GmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	111
G000571	sgRNA	mG*mU*mC*ACAGAAACACUCACCGUGUUUUA GAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGU UAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUm UmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCm GmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	112
G000572	sgRNA	mC*mC*mC*CUACUCCUAUUCACCAGUUUUAG AmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUU AAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmU mGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmG mAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	113
G000502	sgRNA	mA*mC*mA*CAAUACCAGUCCAGCGGUUUUA GAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGU UAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUm UmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCm GmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	114
G000503	sgRNA	mA*mA*mA*AGGCUGCUGAUGAGACCGUUUUA GAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGU UAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUm UmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCm GmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	115
G000504	sgRNA	mA*mA*mA*GGCUGCUGAUGAGACCGUUUUA GAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGU UAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUm UmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCm GmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	116
G000505	sgRNA	mC*mA*mU*UGACAGCAGGACUGCCUGUUUUA GAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGU UAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUm UmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCm GmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	117

G000506	sgRNA	mA*mU*mA*CCAGUCCAGCGAGGCAGGUUUUA GAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGU UAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUm UmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCm GmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	118
G000507	sgRNA	mC*mC*mA*GUCCAGCGAGGCAGAGGGUUUA GAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGU UAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUm UmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCm GmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	119
G000508	sgRNA	mC*mC*mU*CCUCUGCCUCGCGGACGUUUUAG AmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUU AAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmU mGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmG mAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	120
G000509	sgRNA	mA*mA*mA*GUUCUAGAUGCCGUCGGUUUA GAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGU UAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUm UmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCm GmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	121
G000510	sgRNA	mA*mC*mU*UGUCUUCUCUAUACCCAGUUUA GAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGU UAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUm UmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCm GmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	122
G000511	sgRNA	mA*mA*mG*UGACUUCAGUAAGAUGUUUA GAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGU UAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUm UmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCm GmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	123
G000282	sgRNA	mU*mU*mA*CAGCCACGUCUACAGCAGUUUA GAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGU UAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUm UmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCm GmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	124

	Не используется	125 to 200
<p>ДНК, кодирующая последовательность Cas9 с использованием аналога тимидина минимальных кодонов уридина, перечисленных в Таблице 3, со старт и стоп кодонами</p>	<p>ATGGACAAGAAGTACAGCATCGGACTGGACATC GGAACAAACAGCGTCGGATGGGCAGTCATCAC AGACGAATACAAGGTCCCGAGCAAGAAGTTCA AGGTCCTGGGAAACACAGACAGACACAGCATC AAGAAGAACCTGATCGGAGCACTGCTGTTCGAC AGCGGAGAAACAGCAGAAGCAACAAGACTGAA GAGAACAGCAAGAAGAAGATACACAAGAAGAA AGAACAGAATCTGCTACCTGCAGGAAATCTTCA GCAACGAAATGGCAAAGGTGACGACAGCTTCT TCCACAGACTGGAAGAAAGCTTCCTGGTCTGAAG AAGACAAGAAGCACGAAAGACACCCGATCTTC GGAAACATCGTCGACGAAGTCGCATACCACGAA AAGTACCCGACAATCTACCACCTGAGAAAGAAG CTGGTCGACAGCACAGACAAGGCAGACCTGAG ACTGATCTACCTGGCACTGGCACACATGATCAA GTTTCAGAGGACACTTCCTGATCGAAGGAGACCT GAACCCGGACAACAGCGACGTCGACAAGCTGTT CATCCAGCTGGTCCAGACATAACAACCAGCTGTT CGAAGAAAACCCGATCAACGCAAGCGGAGTCG ACGCAAAGGCAATCCTGAGCGCAAGACTGAGC AAGAGCAGAAGACTGGAAAACCTGATCGCACA GCTGCCGGGAGAAAAGAAGAACGGACTGTTCG GAAACCTGATCGCACTGAGCCTGGGACTGACAC CGAACTTCAAGAGCAACTTCGACCTGGCAGAAG ACGCAAAGCTGCAGCTGAGCAAGGACACATAC GACGACGACCTGGACAACCTGCTGGCACAGATC GGAGACCAGTACGCAGACCTGTTCTGGCAGCA AAGAACCTGAGCGACGCAATCCTGCTGAGCGAC ATCCTGAGAGTCAACACAGAAATCACAAAGGC ACCGCTGAGCGCAAGCATGATCAAGAGATACG ACGAACACCACCAGGACCTGACACTGCTGAAGG CACTGGTCAGACAGCAGCTGCCGAAAAGTACA AGGAAATCTTCTTCGACCAGAGCAAGAACGGAT</p>	201

ACGCAGGATACATCGACGGAGGAGCAAGCCAG
GAAGAATTCTACAAGTTCATCAAGCCGATCCTG
GAAAAGATGGACGGAACAGAAGAAGCTGCTGGT
CAAGCTGAACAGAGAAGACCTGCTGAGAAAGC
AGAGAACATTCGACAACGGAAGCATCCCGCACC
AGATCCACCTGGGAGAAGCTGCACGCAATCCTGA
GAAGACAGGAAGACTTCTACCCGTTCTGAAGG
ACAACAGAGAAAAGATCGAAAAGATCCTGACA
TTCAGAATCCCGTACTACGTCGGACCGCTGGCA
AGAGGAAACAGCAGATTCGCATGGATGACAAG
AAAGAGCGAAGAAACAATCACACCGTGGAAGT
TCGAAGAAGTCGTCGACAAGGGAGCAAGCGCA
CAGAGCTTCATCGAAAGAATGACAAACTTCGAC
AAGAACCTGCCGAACGAAAAGGTCCTGCCGAA
GCACAGCCTGCTGTACGAATACTTCACAGTCTA
CAACGAACTGACAAAGGTCAAGTACGTCACAG
AAGGAATGAGAAAGCCGGCATTCTGAGCGGA
GAACAGAAGAAGGCAATCGTCGACCTGCTGTTC
AAGACAAACAGAAAGGTCACAGTCAAGCAGCT
GAAGGAAGACTACTTCAAGAAGATCGAATGCTT
CGACAGCGTCGAAATCAGCGGAGTCGAAGACA
GATTCAACGCAAGCCTGGGAACATAACCACGACC
TGCTGAAGATCATCAAGGACAAGGACTTCCTGG
ACAACGAAGAAAACGAAGACATCCTGGAAGAC
ATCGTCCTGACACTGACACTGTTCTGAAGACAGA
GAAATGATCGAAGAAAGACTGAAGACATACGC
ACACCTGTTCGACGACAAGGTCATGAAGCAGCT
GAAGAGAAGAAGATACACAGGATGGGGAAGAC
TGAGCAGAAAGCTGATCAACGGAATCAGAGAC
AAGCAGAGCGGAAAGACAATCCTGGACTTCCTG
AAGAGCGACGGATTTCGCAAACAGAACTTCATG
CAGCTGATCCACGACGACAGCCTGACATTCAAG
GAAGACATCCAGAAGGCACAGGTCAGCGGACA
GGGAGACAGCCTGCACGAACACATCGCAAACCT
GGCAGGAAGCCCGGCAATCAAGAAGGGAATCC

TGCAGACAGTCAAGGTCGTCGACGAACTGGTCA
AGGTCATGGGAAGACACAAGCCGAAAACATC
GTCATCGAAATGGCAAGAGAAAACCAGACAAC
ACAGAAGGGACAGAAGAACAGCAGAGAAAGAA
TGAAGAGAATCGAAGAAGGAATCAAGGAACTG
GGAAGCCAGATCCTGAAGGAACACCCGGTCGA
AAACACACAGCTGCAGAACGAAAAGCTGTACCT
GTACTACCTGCAGAACGGAAGAGACATGTACGT
CGACCAGGAACTGGACATCAACAGACTGAGCG
ACTACGACGTCGACCACATCGTCCCGCAGAGCT
TCCTGAAGGACGACAGCATCGACAACAAGGTCC
TGACAAGAAGCGACAAGAACAGAGGAAAGAGC
GACAACGTCCCGAGCGAAGAAGTCGTCAAGAA
GATGAAGAACTACTGGAGACAGCTGCTGAACGC
AAAGCTGATCACACAGAGAAAGTTCGACAACCT
GACAAAGGCAGAGAGAGGAGGACTGAGCGAAC
TGGACAAGGCAGGATTCATCAAGAGACAGCTG
GTCGAAACAAGACAGATCACAAGCACGTCGC
ACAGATCCTGGACAGCAGAATGAACACAAAGT
ACGACGAAAACGACAAGCTGATCAGAGAAGTC
AAGGTCATCACACTGAAGAGCAAGCTGGTCAGC
GACTTCAGAAAGGACTTCCAGTTCTACAAGGTC
AGAGAAATCAACA ACTACCACCACGCACACGA
CGCATACTGAACGCAGTCGTCGGAACAGCACT
GATCAAGAAGTACCCGAAGCTGGAAAGCGAAT
TCGTCTACGGAGACTACAAGGTCTACGACGTCA
GAAAGATGATCGCAAAGAGCGAACAGGAAATC
GGAAAGGCAACAGCAAAGTACTTCTTCTACAGC
AACATCATGAACTTCTTCAAGACAGAAATCACA
CTGGCAAACGGAGAAATCAGAAAGAGACCGCT
GATCGAAACAAACGGAGAAACAGGAGAAATCG
TCTGGGACAAGGGAAGAGACTTCGCAACAGTCA
GAAAGGTCCTGAGCATGCCGCAGGTCAACATCG
TCAAGAAGACAGAAGTCCAGACAGGAGGATTC
AGCAAGGAAAGCATCCTGCCGAAGAGAAACAG

	<p>CGACAAGCTGATCGCAAGAAAGAAGGACTGGG ACCCGAAGAAGTACGGAGGATTCGACAGCCCG ACAGTCGCATACAGCGTCCTGGTCGTCGCAAAG GTCGAAAAGGGAAAGAGCAAGAAGCTGAAGAG CGTCAAGGAACTGCTGGGAATCACAATCATGGA AAGAAGCAGCTTCGAAAAGAACCCGATCGACTT CCTGGAAGCAAAGGGATACAAGGAAGTCAAGA AGGACCTGATCATCAAGCTGCCGAAGTACAGCC TGTTTCGAACTGGAAAACGGAAGAAAGAGAATG CTGGCAAGCGCAGGAGAACTGCAGAAGGGAAA CGAACTGGCACTGCCGAGCAAGTACGTCAACTT CCTGTACCTGGCAAGCCACTACGAAAAGCTGAA GGGAAGCCCGGAAGACAACGAACAGAAGCAGC TGTTTCGTCGAACAGCACAAGCACTACCTGGACG AAATCATCGAACAGATCAGCGAATTCAGCAAGA GAGTCATCCTGGCAGACGCAAACCTGGACAAGG TCCTGAGCGCATAACAAGCACAGAGACAAG CCGATCAGAGAACAGGCAGAAAACATCATCCA CCTGTTCACACTGACAAACCTGGGAGCACCCGGC AGCATTCAAGTACTTCGACACAACAATCGACAG AAAGAGATACACAAGCACAAAGGAAGTCCTGG ACGCAACACTGATCCACCAGAGCATCACAGGAC TGTACGAAACAAGAATCGACCTGAGCCAGCTGG GAGGAGACGGAGGAGGAAGCCCGAAGAAGAAG AGAAAGGTCTAG</p>	
<p>ДНК кодирующая последовательность Cas 9, включающая кодоны с высокой общей экспрессией у человека</p>	<p>ATGGATAAGAAGTACTCAATCGGGCTGGATATC GGAACTAATTCCGTGGGTTGGGCAGTGATCACG GATGAATACAAAGTGCCGTCCAAGAAGTTCAAG GTCCTGGGGAACACCGATAGACACAGCATCAAG AAAAATCTCATCGGAGCCCTGCTGTTTGACTCC GGCGAAACCGCAGAAGCGACCCGGCTCAAACG TACCGCGAGGCGACGCTACACCCGGCGGAAGA ATCGCATCTGCTATCTGCAAGAGATCTTTTCGAA CGAAATGGCAAAGGTCGACGACAGCTTCTTCCA CCGCCTGGAAGAATCTTTCCTGGTGGAGGAGGA</p>	<p>202</p>

CAAGAAGCATGAACGGCATCCTATCTTTGGAAA
CATCGTCGACGAAGTGGCGTACCACGAAAAGTA
CCCGACCATCTACCATCTGCGGAAGAAGTTGGT
TGACTCAACTGACAAGGCCGACCTCAGATTGAT
CTACTTGGCCCTCGCCATATGATCAAATTCCGC
GGACACTTCCTGATCGAAGGCGATCTGAACCCT
GATAACTCCGACGTGGATAAGCTTTTCATTCAA
CTGGTGCAGACCTACAACCAACTGTTCGAAGAA
AACCCAATCAATGCTAGCGGCGTCGATGCCAAG
GCCATCCTGTCCGCCCGGCTGTCGAAGTCGCGG
CGCCTCGAAAACCTGATCGCACAGCTGCCGGA
GAGAAAAGAACGGACTTTTCGGCAACTTGATC
GCTCTCTCACTGGGACTCACTCCAATTTCAAGT
CCAATTTTGACCTGGCCGAGGACGCGAAGCTGC
AACTCTCAAAGGACACCTACGACGACGACTTGG
ACAATTTGCTGGCACAAATTGGCGATCAGTACG
CGGATCTGTTCTTGCCGCTAAGAACCTTTCGGA
CGCAATCTTGCTGTCCGATATCCTGCGCGTGAA
CACCGAAATAACCAAAGCGCCGCTTAGCGCCTC
GATGATTAAGCGGTACGACGAGCATCACCAGGA
TCTCACGCTGCTCAAAGCGCTCGTGAGACAGCA
ACTGCCTGAAAAGTACAAGGAGATCTTCTTCGA
CCAGTCCAAGAATGGGTACGCAGGGTACATCGA
TGGAGGCGCTAGCCAGGAAGAGTTCTATAAGTT
CATCAAGCCAATCCTGGAAAAGATGGACGGAA
CCGAAGAACTGCTGGTCAAGCTGAACAGGGAG
GATCTGCTCCGGAAACAGAGAACCTTTGACAAC
GGATCCATTCCCCACCAGATCCATCTGGGTGAG
CTGCACGCCATCTTGCGGCGCCAGGAGGACTTT
TACCCATTCTCAAGGACAACCGGGAAAAGATC
GAGAAAATTCTGACGTTCCGCATCCCGTATTAC
GTGGGCCCACTGGCGCGCGGCAATTCGCGCTTC
GCGTGGATGACTAGAAAATCAGAGGAAACCAT
CACTCCTTGGAATTTTCGAGGAAGTTGTGGATAA
GGGAGCTTCGGCACAAAGCTTCATCGAACGAAT

GACCAACTTCGACAAGAATCTCCCAAACGAGAA
GGTGCTTCTAAGCACAGCCTCCTTTACGAATA
CTTCACTGTCTACAACGAACTGACTAAAGTGAA
ATACGTTACTGAAGGAATGAGGAAGCCGGCCTT
TCTGTCCGGAGAACAGAAGAAAGCAATTGTCTGA
TCTGCTGTTCAAGACCAACCGCAAGGTGACCGT
CAAGCAGCTTAAAGAGGACTACTTCAAGAAGAT
CGAGTGTTTCGACTCAGTGGAAATCAGCGGGGT
GGAGGACAGATTCAACGCTTCGCTGGGAACCTA
TCATGATCTCCTGAAGATCATCAAGGACAAGGA
CTTCCTTGACAACGAGGAGAACGAGGACATCCT
GGAAGATATCGTCCTGACCTTGACCCTTTTCGA
GGATCGCGAGATGATCGAGGAGAGGCTTAAGA
CCTACGCTCATCTCTTCGACGATAAGGTCATGA
AACAACTCAAGCGCCGCGGTACACTGGTTGGG
GCCGCCTCTCCCGCAAGCTGATCAACGGTATTC
GCGATAAACAGAGCGGTAAACTATCCTGGATT
TCCTCAAATCGGATGGCTTCGCTAATCGTAACTT
CATGCAATTGATCCACGACGACAGCCTGACCTT
TAAGGAGGACATCCAAAAAGCACAAGTGTCCG
GACAGGGAGACTCACTCCATGAACACATCGCGA
ATCTGGCCGGTTCGCCGGCGATTAAGAAGGGAA
TTCTGCAAACCTGTGAAGGTGGTCGACGAGCTGG
TGAAGGTCATGGGACGGCACAACCGGAGAAT
ATCGTGATTGAAATGGCCCGAGAAAACCAGACT
ACCCAGAAGGGCCAGAAAACTCCCGCGAAAG
GATGAAGCGGATCGAAGAAGGAATCAAGGAGC
TGGGCAGCCAGATCCTGAAAGAGCACCCGGTGG
AAAACACGCAGCTGCAGAACGAGAAGCTCTAC
CTGTACTATTTGCAAAATGGACGGGACATGTAC
GTGGACCAAGAGCTGGACATCAATCGGTTGTCT
GATTACGACGTGGACCACATCGTTCCACAGTCC
TTTCTGAAGGATGACTCGATCGATAACAAGGTG
TTGACTCGCAGCGACAAGAACAGAGGGAAGTC
AGATAATGTGCCATCGGAGGAGGTTCGTGAAGA

AGATGAAGAATTACTGGCGGCAGCTCCTGAATG
CGAAGCTGATTACCCAGAGAAAGTTTGACAATC
TACTAAAGCCGAGCGCGGGCGGACTCTCAGAGC
TGGATAAGGCTGGATTCATCAAACGGCAGCTGG
TCGAGACTCGGCAGATTACCAAGCACGTGGCGC
AGATCTTGGACTCCCGCATGAACACTAAATACG
ACGAGAACGATAAGCTCATCCGGGAAGTGAAG
GTGATTACCCTGAAAAGCAAACCTTGTGTCTGGAC
TTTCGGAAGGACTTTCAGTTTTACAAAGTGAGA
GAAATCAACAACCTACCATCACGCGCATGACGCA
TACCTCAACGCTGTGGTTCGGTACCGCCCTGATC
AAAAAGTACCCTAAACTTGAATCGGAGTTTGTG
TACGGAGACTACAAGGTCTACGACGTGAGGAA
GATGATAGCCAAGTCCGAACAGGAAATCGGGA
AAGCAACTGCGAAATACTTCTTTTACTCAAACA
TCATGAACTTTTTCAAGACTGAAATTACGCTGG
CCAATGGAGAAATCAGGAAGAGGCCACTGATC
GAAACTAACGGAGAAACGGGCGAAATCGTGTG
GGACAAGGGCAGGGACTTCGCAACTGTTTCGCAA
AGTGCTCTCTATGCCGCAAGTCAATATTGTGAA
GAAAACCGAAGTGCAAACCGGCGGATTTTCAA
GGAATCGATCCTCCCAAAGAGAAATAGCGACA
AGCTCATTGCACGCAAGAAAGACTGGGACCCGA
AGAAGTACGGAGGATTCGATTCGCCGACTGTCTG
CATACTCCGTCTCTCGTGGTGGCCAAGGTGGAGA
AGGGAAAGAGCAAAAAGCTCAAATCCGTCAA
GAGCTGCTGGGGATTACCATCATGGAACGATCC
TCGTTCGAGAAGAACCCGATTGATTTCTCGAG
GCGAAGGGTTACAAGGAGGTGAAGAAGGATCT
GATCATCAAACCTCCCAAGTACTCACTGTTCTGA
ACTGGAAAATGGTCGGAAGCGCATGCTGGCTTC
GGCCGGAGAACTCCAAAAAGGAAATGAGCTGG
CCTTGCCTAGCAAGTACGTCAACTTCTCTATCT
TGCTTCGCACTACGAAAACTCAAAGGGTCACC
GGAAGATAACGAACAGAAGCAGCTTTTCGTGGA

	<p>GCAGCACAAGCATTATCTGGATGAAATCATCGA ACAAATCTCCGAGTTTTCAAAGCGCGTGATCCT CGCCGACGCCAACCTCGACAAAGTCCTGTCGGC CTACAATAAGCATAGAGATAAGCCGATCAGAG AACAGGCCGAGAACATTATCCACTTGTTCACCC TGACTAACCTGGGAGCCCCAGCCGCCTTCAAGT ACTTCGATACTACTATCGATCGCAAAAGATACA CGTCCACCAAGGAAGTTCTGGACGCGACCCTGA TCCACCAAAGCATCACTGGACTCTACGAAACTA GGATCGATCTGTTCGACGCTGGGTGGCGATGGCG GTGGATCTCCGAAAAAGAAGAGAAAGGTGTAA TGA</p>	
<p>Аминокислотная последовательность Cas 9, с одним сигналом ядерной локализации (1xNLS), как у 7 С- терминальных аминокислот</p>	<p>MDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKV LGNTDRHSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTAR RRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFHRLEES FLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLR KKLVDSTDKADLRLIYLALAHMIKFRGHFLIEGDL NPDNSDVDFLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAK AILSARLSKSRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALS LGLTPNFKSNFDLAEDAQLSKDTYDDDLNLL AQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKA PLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEI FFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDG TEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELH AILRRQEDFYFPLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLA RGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEEVVDKGASAQS FIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYFTVYNELT KVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKV TVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTY HDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDRE MIEERLKYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLS RKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANRNFMLIH DDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAI KKGILQTVKVVDLKVVMGRHKPENIVIAMAREN QTTQKGQKNSRERMKRIIEGIKELGSQILKEHPVE</p>	<p>203</p>

	<p>NTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSD YDVDHIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDN VPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTK AERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDS RMNTKYDENDKLIREVKVITLKSKLVSDFRKDFQF YKVREINNYHHAHDAYLNAVVGTA LIKKYPKLES EFVYGDYKVYDVRKMIKSEQEIGKATAKYFFYS NIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDK GRDFATVRKVL SMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESIL PKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLV VAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIMERSSEFKNPIDF LEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLAS AGELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGSPE DNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVLADAN LDKVL SAYNKH RDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAP AAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVL DATLIHQ SITGLYE TRIDLSQLGGGGGSPKKKRKV</p>	
<p>мРНК Cas 9 с ORF, включающей минимальные уридиновые кодоны, со старт и стоп кодонами</p>	<p>AUGGACAAGAAGUACAGCAUCGGACUGGACAU CGGAACAAACAGCGUCGGAUGGGCAGUCAUCA CAGACGAAUACAAGGUCCCGAGCAAGAAGUUC AAGGUCCUGGGAAACACAGACAGACACAGCAU CAAGAAGAACCUGAUCGGAGCACUGCUGUUCG ACAGCGGAGAAACAGCAGAAGCAACAAGACUG AAGAGAACAGCAAGAAGAAGAUACACAAGAAG AAAGAACAGAAUCUGCUACCUGCAGGAAAUCU UCAGCAACGAAAUGGCAAAGGUCGACGACAGC UUCUCCACAGACUGGAAGAAAGCUUCCUGGU CGAAGAAGACAAGAAGCACGAAAGACACCCGA UCUUCGGAAACAUCGUCGACGAAGUCGCAUAC CACGAAAAGUACCCGACAAUCUACCACCUGAG AAAGAAGCUGGUCGACAGCACAGACAAGGCAG ACCUGAGACUGAUCUACCUGGCACUGGCACAC AUGAUCAAGUUCAGAGGACACUUCUGAUCGA AGGAGACCUGAACCCGGACAACAGCGACGUCG ACAAGCUGUUCAUCCAGCUGGUCCAGACAUAC</p>	<p>204</p>

AACCAGCUGUUCGAAGAAAACCCGAUCAACGC
AAGCGGAGUCGACGCAAAGGCAAUCCUGAGCG
CAAGACUGAGCAAGAGCAGAAGACUGGAAAAC
CUGAUCGCACAGCUGCCGGGAGAAAAGAAGAA
CGGACUGUUCGGAAACCUGAUCGCACUGAGCC
UGGGACUGACACCGAACUUCAAGAGCAACUUC
GACCUGGCAGAAGACGCAAAGCUGCAGCUGAG
CAAGGACACAUACGACGACGACCUGGACAACC
UGCUGGCACAGAUCGGAGACCAGUACGCAGAC
CUGUUCCUGGCAGCAAAGAACCUGAGCGACGC
AAUCCUGCUGAGCGACAUCUGAGAGUCAACA
CAGAAAUCACAAAGGCACCGCUGAGCGCAAGC
AUGAUCAAGAGAUACGACGAACACCACCAGGA
CCUGACACUGCUGAAGGCACUGGUCAGACAGC
AGCUGCCGGAAAAGUACAAGGAAAUCUUCUUC
GACCAGAGCAAGAACGGAUACGCAGGAUACAU
CGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAAUUCUACA
AGUUCAUCAAGCCGAUCCUGGAAAAGAUGGAC
GGAACAGAAGAACUGCUGGUCAAGCUGAACAG
AGAAGACCUGCUGAGAAAGCAGAGAACAUUCG
ACAACGGAAGCAUCCCGCACCCAGAUCCACCUG
GGAGAACUGCACGCAAUCCUGAGAAGACAGGA
AGACUUCUACCCGUUCCUGAAGGACAACAGAG
AAAAGAUUCGAAAAGAUCCUGACAUUCAGAAUC
CCGUACUACGUCGGACCGCUGGCAAGAGGAAA
CAGCAGAUUCGCAUGGAUGACAAGAAAGAGCG
AAGAAACAAUCACACCGUGGAACUUCGAAGAA
GUCGUCGACAAGGGAGCAAGCGCACAGAGCUU
CAUCGAAAGAAUGACAAACUUCGACAAGAACC
UGCCGAACGAAAAGGUCCUGCCGAAGCACAGC
CUGCUGUACGAAUACUUCACAGUCUACAACGA
ACUGACAAAGGUCAAGUACGUCACAGAAGGAA
UGAGAAAGCCGGCAUUCUGAGCGGAGAACAG
AAGAAGGCAAUCGUCGACCUGCUGUUCAAGAC
AAACAGAAAGGUCACAGUCAAGCAGCUGAAGG

AAGACUACUUCAAGAAGAUCGAAUGCUUCGAC
AGCGUCGAAAUCAGCGGAGUCGAAGACAGAUU
CAACGCAAGCCUGGGAACAUACCACGACCUGC
UGAAGAUCAUCAAGGACAAGGACUUCCUGGAC
AACGAAGAAAACGAAGACAUCCUGGAAGACAU
CGUCCUGACACUGACACUGUUCGAAGACAGAG
AAAUGAUCGAAGAAAGACUGAAGACAUACGCA
CACCUGUUCGACGACAAGGUCAUGAAGCAGCU
GAAGAGAAGAAGAUACACAGGAUUGGGGAAGA
CUGAGCAGAAAGCUGAUAACGGAAUCAGAGA
CAAGCAGAGCGGAAAGACAAUCCUGGACUUCC
UGAAGAGCGACGGAUUCGCAAACAGAAACUUC
AUGCAGCUGAUCCACGACGACAGCCUGACAUI
CAAGGAAGACAUCCAGAAGGCACAGGUCAGCG
GACAGGGAGACAGCCUGCACGAACACAUCGCA
AACCUGGCAGGAAGCCCGGCAAUCAAGAAGGG
AAUCCUGCAGACAGUCAAGGUCGUCGACGAAC
UGGUCAAGGUCAUGGGAAGACACAAGCCGGAA
AACAUUCGUCAUCGAAAUGGCAAGAGAAAACCA
GACAACACAGAAGGGACAGAAGAACAGCAGAG
AAAGAAUGAAGAGAAUCGAAGAAGGAAUCA
GGAACUGGGAAGCCAGAUCUGAAGGAACACC
CGGUCGAAAACACACAGCUGCAGAACGAAAAG
CUGUACCUGUACUACCUGCAGAACGGAAGAGA
CAUGUACGUCGACCAGGAACUGGACAUCAACA
GACUGAGCGACUACGACGUCGACCACAUCGUC
CCGCAGAGCUUCCUGAAGGACGACAGCAUCGA
CAACAAGGUCCUGACAAGAAGCGACAAGAACA
GAGGAAAGAGCGACAACGUCCCGAGCGAAGAA
GUCGUCAAGAAGAUGAAGAACUACUGGAGACA
GCUGCUGAACGCAAAGCUGAUCACACAGAGAA
AGUUCGACAACCUGACAAGGCAGAGAGAGGA
GGACUGAGCGAACUGGACAAGGCAGGAUUCAU
CAAGAGACAGCUGGUCGAAACAAGACAGAUCA
CAAAGCACGUCGCACAGAUCUGGACAGCAGA

AUGAACACAAAGUACGACGAAAACGACAAGCU
GAUCAGAGAAGUCAAGGUCAUCACACUGAAGA
GCAAGCUGGUCAGCGACUUCAGAAAGGACUUC
CAGUUCUACAAGGUCAGAGAAAUCAACAACUA
CCACCACGCACACGACGCAUACCUGAACGCAG
UCGUCGGAACAGCACUGAUCAAGAAGUACCCG
AAGCUGGAAAGCGAAUUCGUCUACGGAGACUA
CAAGGUCUACGACGUCAGAAAGAUGAUCGCAA
AGAGCGAACAGGAAAUCGGAAAGGCAACAGCA
AAGUACUUCUUCUACAGCAACAUCAUGAACUU
CUUCAAGACAGAAAUCACACUGGCAAACGGAG
AAAUCAGAAAGAGACCGCUGAUCGAAACAAAC
GGAGAAACAGGAGAAAUCGUCUGGGACAAGGG
AAGAGACUUCGCAACAGUCAGAAAGGUCCUGA
GCAUGCCGCAGGUCAACAUCGUCAAGAAGACA
GAAGUCCAGACAGGAGGAUUCAGCAAGGAAAG
CAUCCUGCCGAAGAGAAACAGCGACAAGCUGA
UCGCAAGAAAGAAGGACUGGGACCCGAAGAAG
UACGGAGGAUUCGACAGCCCGACAGUCGCAUA
CAGCGUCCUGGUCGUCGCAAAGGUCGAAAAGG
GAAAGAGCAAGAAGCUGAAGAGCGUCAAGGAA
CUGCUGGGAAUCACAAUCAUGGAAAGAAGCAG
CUUCGAAAAGAACCCGAUCGACUUCUGGAAG
CAAAGGGAUACAAGGAAGUCAAGAAGGACCUG
AUCAUCAAGCUGCCGAAGUACAGCCUGUUCGA
ACUGGAAAACGGAAGAAAGAGAAUGCUGGCAA
GCGCAGGAGAACUGCAGAAGGGAAACGAACUG
GCACUGCCGAGCAAGUACGUCAACUUCUGUA
CCUGGCAAGCCACUACGAAAAGCUGAAGGGAA
GCCCCGAAGACAACGAACAGAAGCAGCUGUUC
GUCGAACAGCACAAGCACUACCUGGACGAAAU
CAUCGAACAGAUCAGCGAAUUCAGCAAGAGAG
UCAUCCUGGCAGACGCAAACCUGGACAAGGUC
CUGAGCGCAUACAACAAGCACAGAGACAAGCC
GAUCAGAGAACAGGCAGAAAACAUCAUCCACC

	<p>UGUUCACACUGACAAACCUGGGAGCACCGGCA GCAUUCAAGUACUUCGACACAACAAUCGACAG AAAGAGAUACACAAGCACAAAGGAAGUCCUGG ACGCAACACUGAUCCACCAGAGCAUCACAGGA CUGUACGAAACAAGAAUCGACCUGAGCCAGCU GGGAGGAGACGGAGGAGGAAGCCCGAAGAAGA AGAGAAAGGUCUAG</p>	
<p>мРНК Cas 9 с ORF, включающей кодоны с с высокой общей экспрессией у человека, со старт и стоп кодонами</p>	<p>AUGGAUAAGAAGUACUCAAUCCGGCUGGAUUAU CGGAACUAAUUCCGUGGGUUGGGCAGUGAUCA CGGAUGAAUACAAAGUGCCGUCCAAGAAGUUC AAGGUCCUGGGGAACACCGAUAGACACAGCAU CAAGAAAAAUCUCAUCGGAGCCCUGCUGUUUG ACUCCGGCGAAACCGCAGAAGCGACCCGGCUC AAACGUACCGCGAGGCGACGCUACACCCGGCG GAAGAAUCGCAUCUGCUAUCUGCAAGAGAUCU UUUCGAACGAAAUGGCAAAGGUCGACGACAGC UUCUCCACCGCCUGGAAGAAUCUUUCCUGGU GGAGGAGGACAAGAAGCAUGAACGGCAUCCUA UCUUUGGAAACAUCGUCGACGAAGUGGCGUAC CACGAAAAGUACCCGACCAUCUACCAUCUGCG GAAGAAGUUGGUUGACUCAACUGACAAGGCCG ACCUCAGAUUGAUCUACUUGGCCCUCCGCCAU AUGAUCAAAUUCCGCGGACACUUCUGAUCGA AGGCGAUCUGAACCUGAUAACUCCGACGUGG AUAAGCUUUUCAUUAACUGGUGCAGACCUAC AACCAACUGUUCGAAGAAAACCCAAUCAAUGC UAGCGGCGUCGAUGCCAAGGCCAUCCUGUCCG CCCGGCUGUCGAAGUCGCGGCGCCUCGAAAAC CUGAUCGCACAGCUGCCGGGAGAGAAAAGAA CGGACUUUUCGGCAACUUGAUCGCUCUCUCAC UGGGACUCACUCCAAUUUCAAGUCCAAUUUU GACCUGGCCGAGGACGCGAAGCUGCAACUCUC AAAGGACACCUACGACGACGACUUGGACAAUU UGCUGGCACAAAUUGGCGAUCAGUACGCGGAU CUGUCCUUGCCGCUAAGAACCUUUCGGACGC</p>	<p>205</p>

AAUCUUGCUGUCCGAUAUCCUGCGCGUGAACAC
CCGAAAUAACCAAAGCGCCGCUUAGCGCCUCG
AUGAUUAAGCGGUACGACGAGCAUCACCAGGA
UCUCACGCUGCUCAAAAGCGCUCGUGAGACAGC
AACUGCCUGAAAAGUACAAGGAGAUCUUCUUC
GACCAGUCCAAGAAUGGGUACGCAGGGUACAU
CGAUGGAGGGCGCUAGCCAGGAAGAGUUCUAUA
AGUUCAUCAAGCCAAUCCUGGAAAAGAUGGAC
GGAACCGAAGAACUGCUGGUCAAGCUGAACAG
GGAGGAUCUGCUCCGGAAACAGAGAACCUUUG
ACAACGGAUCCAUUCCCCACCAGAUCCAUCUG
GGUGAGCUGCACGCCAUCUUGCGGCGCCAGGA
GGACUUUUACCCAUCCUCAAGGACAACCGGG
AAAAGAUCGAGAAAUUCUGACGUUCCGCAUC
CCGUAAUACGUGGGCCACUGGCGCGCGGCAA
UUCGCGCUUCGCGUGGAUGACUAGAAAUCAG
AGGAAACCAUCACUCCUUGGAAUUUCGAGGAA
GUUGUGGAUAAGGGAGCUUCGGCACAAAGCUU
CAUCGAACGAAUGACCAACUUCGACAAGAAUC
UCCCAAACGAGAAGGUGCUUCCUAAGCACAGC
CUCCUUUACGAAUACUUCACUGUCUACAACGA
ACUGACUAAAGUGAAAUACGUUACUGAAGGAA
UGAGGAAGCCGGCCUUUCUGUCCGGAGAACAG
AAGAAAGCAAUUGUCGAUCUGCUGUUCAAGAC
CAACCGCAAGGUGACCGUCAAGCAGCUUAAAG
AGGACUACUUCAAGAAGAUCGAGUGUUUCGAC
UCAGUGGAAAUCAGCGGGGUGGAGGACAGAUU
CAACGCUUCGCUGGGAACCUAUCAUGAUCUCC
UGAAGAUCAUCAAGGACAAGGACUCCUUGAC
AACGAGGAGAACGAGGACAUCCUGGAAGAUAU
CGUCCUGACCUUGACCCUUUUCGAGGAUCGCG
AGAUGAUCGAGGAGAGGCUUAAGACCUACGCU
CAUCUCUUCGACGAUAAGGUCAUGAAACAACU
CAAGCGCCGCCGGUACACUGGUUGGGGCCGCC
UCUCCCGCAAGCUGAUAACGGUAUUCGCGAU

AAACAGAGCGGUAAAACUAUCCUGGAUUUCCU
CAAUUCGGAUGGCUUCGCUAAUCGUAACUUCA
UGCAAUUGAUCCACGACGACAGCCUGACCUUU
AAGGAGGACAUCCAAAAAGCACAAAGUGUCCGG
ACAGGGAGACUCACUCCAUGAACACAUCGCGA
AUCUGGCCGGUUCGCCGGCGAUUAAGAAGGGA
AUUCUGCAAACUGUGAAGGUGGUCGACGAGCU
GGUGAAGGUCAUGGGACGGCACAAACCGGAGA
AUAUCGUGAUUGAAAUGGCCCGAGAAAACCAG
ACUACCCAGAAGGGCCAGAAAACUCCCGCGA
AAGGAUGAAGCGGAUCGAAGAAGGAAUCAAG
GAGCUGGGCAGCCAGAUCUGAAAGAGCACCC
GGUGGAAAACACGCAGCUGCAGAACGAGAAGC
UCUACCUGUACUAUUUGCAAAAUGGACGGGAC
AUGUACGUGGACCAAGAGCUGGACAUCAUCG
GUUGUCUGAUUACGACGUGGACCACAUCGUUC
CACAGUCCUUCUGAAGGAUGACUCGAUCGAU
ACAAGGUGUUGACUCGCAGCGACAAGAACAG
AGGGAAGUCAGAUAAUGUGCCAUCGGAGGAGG
UCGUGAAGAAGAUGAAGAAUUACUGGCGGCAG
CUCCUGAAUGCGAAGCUGAUUACCCAGAGAAA
GUUUGACAAUCUCACUAAAGCCGAGCGCGGCG
GACUCUCAGAGCUGGAUAAGGCUGGAUUCAUC
AAACGGCAGCUGGUCGAGACUCGGCAGAUUAC
CAAGCACGUGGCGCAGAUCUUGGACUCCCGCA
UGAACACUAAAUACGACGAGAACGAUAAGCUC
AUCCGGGAAGUGAAGGUGAUUACCCUGAAAAG
CAAACUUGUGUCGGACUUUCGGAAGGACUUUC
AGUUUUACAAAGUGAGAGAAAUCAACAACUAC
CAUCACGCGCAUGACGCAUACCUCAACGCUGU
GGUCGGUACCGCCUGAUCAAAAAGUACCCUA
AACUUGAAUCGGAGUUUGUGUACGGAGACUAC
AAGGUCUACGACGUGAGGAAGAUGAUAGCCAA
GUCCGAACAGGAAAUCGGGAAAGCAACUGCGA
AAUACUUCUUUUACUCAAAACAUCAUGAACUUU

	<p>UUCAAGACUGAAAUUACGCUGGCCAAUGGAGA AAUCAGGAAGAGGCCACUGAUCGAAACUAACG GAGAAACGGGCGAAAUCGUGUGGGACAAGGGC AGGGACUUCGCAACUGUUCGCAAAGUGCUCUC UAUGCCGCAAGUCAAUUUGUGAAGAAAACCG AAGUGCAAACCGGCGGAUUUCAAAGGAAUCG AUCCUCCCAAAGAGAAAUAAGCGACAAGCUCAU UGCACGCAAGAAAGACUGGGACCCGAAGAAGU ACGGAGGAUUCGAUUCGCCGACUGUCGCAUAC UCCGUCCUCGUGGUGGCCAAGGUGGAGAAGGG AAAGAGCAAAAAGCUCAAAUCCGUCAAAGAGC UGCUGGGGAUUACCAUCAUGGAACGAUCCUCG UUCGAGAAGAACCCGAUUGAUUUCUCGAGGC GAAGGGUUACAAGGAGGUGAAGAAGGAUCUG AUCAUCAAAACUCCCAAGUACUCACUGUUCGA ACUGGAAAAUGGUCGGAAGCGCAUGCUGGCUU CGGCCGGAGAACUCCAAAAAGGAAAUGAGCUG GCCUUGCCUAGCAAGUACGUCAACUUCUCUA UCUUGCUUCGCACUACGAAAAACUCAAGGGU CACCGGAAGAUAACGAACAGAAGCAGCUUUUC GUGGAGCAGCACAAAGCAUUAUCUGGAUGAAAU CAUCGAACAAAUCUCCGAGUUUUCAAAGCGCG UGAUCCUCGCCGACGCCAACCCUCGACAAAGUC CUGUCGGCCUACAAUAAGCAUAGAGAUAAAGCC GAUCAGAGAACAGGCCGAGAACAUUAUCCACU UGUUCACCCUGACUAACCUGGGAGCCCAGCC GCCUUCAAGUACUUCGAUACUACUAUCGAUCG CAAAGAUACACGUCCACCAAGGAAGUUCUGG ACGCGACCCUGAUCCACCAAAGCAUCACUGGA CUCUACGAAACUAGGAUCGAUCUGUCGCAGCU GGGUGGCGAUGGCGGUGGAUCUCCGAAAAAGA AGAGAAAGGUGUAAUGA</p>	
<p>Аминокислотная последовательность Cas 9 нуклеотиды (D10A)</p>	<p>MDKKYSIGLAIGTNSVGWAVITDEYKVPSSKFKV LGNTDRHSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTAR RRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFHRLEES</p>	206

FLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLR
KKLVDSTDKADLRLIYLALAHMIKFRGHFLIEGDL
NPDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAK
AILSARLSKSRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALS
LGLTPNFKSNFDLAEDAQLSKDQYDDDLNLL
AQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKA
PLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPKEYKEI
FFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDG
TEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELH
AILRRQEDFYPFKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLA
RGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEEVVDKGASAQS
FIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYFTVYNELT
KVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKV
TVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTY
HDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDRE
MIEERLKYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLS
RKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANRNFMLIH
DDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAI
KKGILQTVKVVDLKVVMGRHKPENIVIEMAREN
QTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQILKEHPVE
NTQLQNEKLYLYLQNGRDMYVDQELDINRLSD
YDVDHIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDN
VPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTK
AERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDS
RMNTKYDENDKLIREVKVITLKSCLVSDFRKDFQF
YKVINNYHHAHDAYLNAVVGTAIHKYPKLES
EFVYGDYKVYDVRKMIKSEQEIGKATAKYFFYS
NIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDK
GRDFATVRKVL SMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESIL
PKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLV
VAKVEKGKSKKLKSVKELGITIMERSSEKPNIDF
LEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLAS
AGELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLGKSPE
DNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVLADAN
LDKVL SAYNKHHRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAP

	AAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQ SITGLYE TRIDLSQLGGDGGGSPKKKRKV	
ORF мПНК Cas 9 никазы (D10A)	AUGGACAAGAAGUACAGCAUCGGACUGGCAAU CGGAACAAACAGCGUCGGAUGGGCAGUCAUCA CAGACGAAUACAAGGUCCCGAGCAAGAAGUUC AAGGUCCUGGGAAACACAGACAGACACAGCAU CAAGAAGAACCUGAUCGGAGCACUGCUGUUCG ACAGCGGAGAAACAGCAGAAGCAACAAGACUG AAGAGAACAGCAAGAAGAAGAUACACAAGAAG AAAGAACAGAAUCUGCUACCUGCAGGAAAUCU UCAGCAACGAAAUGGCAAAGGUCGACGACAGC UUCUUCCACAGACUGGAAGAAAGCUUCCUGGU CGAAGAAGACAAGAAGCACGAAAGACACCCGA UCUUCGGAAACAUCGUCGACGAAGUCGCAUAC CACGAAAAGUACCCGACAAUCUACCACCUGAG AAAGAAGCUGGUCGACAGCACAGACAAGGCAG ACCUGAGACUGAUCUACCUGGCACUGGCACAC AUGAUCAAGUUCAGAGGACACUUCUGAUCGA AGGAGACCUGAACCCGGACAACAGCGACGUCG ACAAGCUGUUCAUCCAGCUGGUCCAGACAUAC AACCAGCUGUUCGAAGAAAACCCGAUCAACGC AAGCGGAGUCGACGCAAAGGCAAUCCUGAGCG CAAGACUGAGCAAGAGCAGAAGACUGGAAAAC CUGAUCGCACAGCUGCCGGGAGAAAAGAAGAA CGGACUGUUCGGAAACCUGAUCGCACUGAGCC UGGGACUGACACCGAACUUAAGAGCAACUUC GACCUGGCAGAAGACGCAAAGCUGCAGCUGAG CAAGGACACAUACGACGACGACCUGGACAACC UGCUGGCACAGAUCGGAGACCAGUACGCAGAC CUGUUCCUGGCAGCAAAGAACCUGAGCGACGC AAUCCUGCUGAGCGACAUCUGAGAGUCAACA CAGAAAUCACAAAGGCACCGCUGAGCGCAAGC AUGAUCAAGAGAUACGACGAACACCACCAGGA CCUGACACUGCUGAAGGCACUGGUCAGACAGC AGCUGCCGGAAAAGUACAAGGAAAUCUUCUUC	207

GACCAGAGCAAGAACGGAUACGCAGGAUACAU
CGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAAUUCUACA
AGUUCAUCAAGCCGAUCCUGGAAAAGAUGGAC
GGAACAGAAGAACUGCUGGUCAAGCUGAACAG
AGAAGACCUGCUGAGAAAGCAGAGAACAUUCG
ACAACGGAAGCAUCCCGCACCAGAUCACCUG
GGAGAACUGCACGCAAUCCUGAGAAGACAGGA
AGACUUCUACCCGUUCCUGAAGGACAACAGAG
AAAAGAUCGAAAAGAUCUGACAUCAGAAUC
CCGUACUACGUCGGACCGCUGGCAAGAGGAAA
CAGCAGAUUCGCAUGGAUGACAAGAAAGAGCG
AAGAAACAAUCACACCGUGGAACUUCGAAGAA
GUCGUCGACAAGGGAGCAAGCGCACAGAGCUU
CAUCGAAAGAAUGACAAACUUCGACAAGAACC
UGCCGAACGAAAAGGUCCUGCCGAAGCACAGC
CUGCUGUACGAAUACUUCACAGUCUACAACGA
ACUGACAAAGGUCAAGUACGUCACAGAAGGAA
UGAGAAAGCCGGCAUUCCUGAGCGGAGAACAG
AAGAAGGCAAUCGUCGACCUGCUGUUCAAGAC
AAACAGAAAGGUCACAGUCAAGCAGCUGAAGG
AAGACUACUUCAAGAAGAUCGAAUGCUUCGAC
AGCGUCGAAAUCAGCGGAGUCGAAGACAGAUU
CAACGCAAGCCUGGGAACAUACCACGACCUGC
UGAAGAUCAUCAAGGACAAGGACUUCCUGGAC
AACGAAGAAAACGAAGACAUCCUGGAAGACAU
CGUCCUGACACUGACACUGUUCGAAGACAGAG
AAAUGAUCGAAGAAAGACUGAAGACAUACGCA
CACCUGUUCGACGACAAGGUCAUGAAGCAGCU
GAAGAGAAGAAGAUACACAGGAUGGGGAAGA
CUGAGCAGAAAGCUGAUCAACGGAAUCAGAGA
CAAGCAGAGCGGAAAGACAAUCCUGGACUUCC
UGAAGAGCGACGGAUUCGCAAACAGAAACUUC
AUGCAGCUGAUCCACGACGACAGCCUGACAUI
CAAGGAAGACAUCCAGAAGGCACAGGUCAGCG
GACAGGGAGACAGCCUGCACGAACACAUCGCA

AACCUGGCAGGAAGCCCGGCAAUCAAGAAGGG
AAUCCUGCAGACAGUCAAGGUCGUCGACGAAC
UGGUCAAGGUCAUGGGAAGACACAAGCCGGAA
ACAUCGUCAUCGAAAUGGCAAGAGAAAACCA
GACAACACAGAAGGGACAGAAGAACAGCAGAG
AAAGAAUGAAGAGAAUCGAAGAAGGAAUCAA
GGAACUGGGAAGCCAGAUCUGAAGGAAACACC
CGGUCGAAAACACACAGCUGCAGAACGAAAAG
CUGUACCUGUACUACCUGCAGAACGGAAGAGA
CAUGUACGUCGACCAGGAACUGGACAUCAACA
GACUGAGCGACUACGACGUCGACCACAUCGUC
CCGCAGAGCUUCCUGAAGGACGACAGCAUCGA
CAACAAGGUCCUGACAAGAAGCGACAAGAACA
GAGGAAAGAGCGACAACGUCCCGAGCGAAGAA
GUCGUCAAGAAGAUGAAGAACUACUGGAGACA
GCUGCUGAACGCAAAGCUGAUCACACAGAGAA
AGUUCGACAACCUGACAAAGGCAGAGAGAGGA
GGACUGAGCGAACUGGACAAGGCAGGAUUCAU
CAAGAGACAGCUGGUCGAAACAAGACAGAUCA
CAAAGCACGUCGCACAGAUCUGGACAGCAGA
AUGAACACAAAGUACGACGAAAACGACAAGCU
GAUCAGAGAAGUCAAGGUCAUCACACUGAAGA
GCAAGCUGGUCAGCGACUUCAGAAAGGACUUC
CAGUUCUACAAGGUCAGAGAAAUCAACAACUA
CCACCACGCACACGACGCAUACCUGAACGCAG
UCGUCGGAACAGCACUGAUCAAGAAGUACCCG
AAGCUGGAAAGCGAAUUCGUCUACGGAGACUA
CAAGGUCUACGACGUCAGAAAGAUGAUCGCAA
AGAGCGAACAGGAAAUCGGAAAGGCAACAGCA
AAGUACUUCUUCUACAGCAACAUCAUGAACUU
CUUCAAGACAGAAAUCACACUGGCAAACGGAG
AAAUCAGAAAGAGACCGCUGAUCGAAACAAAC
GGAGAAACAGGAGAAAUCGUCUGGGACAAGGG
AAGAGACUUCGCAACAGUCAGAAAGGUCCUGA
GCAUGCCGCAGGUCAACAUCGUCAAGAAGACA

	GAAGUCCAGACAGGAGGAUUCAGCAAGGAAAG CAUCCUGCCGAAGAGAAACAGCGACAAGCUGA UCGCAAGAAAGAAGGACUGGGACCCGAAGAAG UACGGAGGAUUCGACAGCCCGACAGUCGCAUA CAGCGUCCUGGUCGUCGCAAAGGUCGAAAAGG GAAAGAGCAAGAAGCUGAAGAGCGUCAAGGAA CUGCUGGGAAUCACAAUCAUGGAAAGAAGCAG CUUCGAAAAGAACCCGAUCGACUCCUGGAAG CAAAGGGAUACAAGGAAGUCAAGAAGGACCUG AUCAUCAAGCUGCCGAAGUACAGCCUGUUCGA ACUGGAAAACGGAAGAAAGAGAAUGCUGGCAA GCGCAGGAGAACUGCAGAAGGGAAACGAACUG GCACUGCCGAGCAAGUACGUCAACUCCUGUA CCUGGCAAGCCACUACGAAAAGCUGAAGGGAA GCCC GGAAGACAACGAACAGAAGCAGCUGUUC GUCGAACAGCACAAGCACUACCUGGACGAAAU CAUCGAACAGAUCAGCGAAUUCAGCAAGAGAG UCAUCCUGGCAGACGCAAACCUGGACAAGGUC CUGAGCGCAUACAACAAGCACAGAGACAAGCC GAUCAGAGAACAGGCAGAAAACAUCAUCCACC UGUUCACACUGACAAACCUGGGAGCACCGGCA GCAUUCAAGUACUUCGACACAACAAUCGACAG AAAGAGAUACACAAGCACAAAGGAAGUCCUGG ACGCAACACUGAUCCACCAGAGCAUCACAGGA CUGUACGAAACAAGAAUCGACCUGAGCCAGCU GGGAGGAGACGGAGGAGGAAGCCCGAAGAAGA AGAGAAAGGUCUAG	
Аминокислотная последовательность dCas 9 (D10A H840A)	MDKKYSIGLAIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKV LGNTDRHSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTAR RRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSSFFHRLEES FLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLR KKLVDSTDKADLRLIYLALAHMIKFRGHFLIEGDL NPDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAK AILSARLSKSRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALS LGLTPNFKSNFDLAEDA KLQLSKDTYDDDLNLL	208

	<p>AQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKA PLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEI FFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDG TEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELH AILRRQEDFYFPLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLA RGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEEVVDKGASAQS FIERMTNFDKNLPNEKVLPHSLLYEYFTVYNELT KVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKV TVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTY HDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDRE MIEERLKYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLS RKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANRNFMLIH DDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAI KKGILQTVKVVDDELVKVMGRHKPENIVIEMAREN QTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQILKEHPVE NTQLQNEKLYLYLQNGRDMYVDQELDINRLSD YDVDAIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDN VPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTK AERGGELSEDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDS RMNTKYDENDKLIREVKVITLKSCLVSDFRKDFQF YK VREINNYHHAHDAYLNAVVGTA LIKKYPKLES EFVYGDYK VYDVRKMIAKSEQEIGKATAKYFFYS NIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDK GRDFATVRKVL SMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESIL PKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLV VAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIMERSSEFEKNPIDF LEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLAS AGELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLGKSPE DNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVLADAN LDKVL SAYNKHRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAP AAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVL DATLIHQ SITGLYE TRIDLSQLGGDGGGSPKKRKV</p>	
<p>ORF mPHK dCas 9 (D10A H840A)</p>	<p>AUGGACAAGAAGUACAGCAUCGGACUGGCAAU CGGAACAAACAGCGUCGGAUGGGCAGUCAUCA CAGACGAAUACAAGGUCCCGAGCAAGAAGUUC</p>	<p>209</p>

AAGGUCCUGGGAAACACAGACAGACACAGCAU
CAAGAAGAACCUGAUCGGAGCACUGCUGUUCG
ACAGCGGAGAAACAGCAGAAGCAACAAGACUG
AAGAGAACAGCAAGAAGAAGAUACACAAGAAG
AAAGAACAGAAUCUGC UACCUGCAGGAAAUCU
UCAGCAACGAAAUGGCAAAGGUCGACGACAGC
UUCUUCCACAGACUGGAAGAAAGCUUCCUGGU
CGAAGAAGACAAGAAGCACGAAAGACACCCGA
UCUUCGGAAACAUCGUCGACGAAGUCGCAUAC
CACGAAAAGUACCCGACAAUCUACCACCUGAG
AAAGAAGCUGGUCGACAGCACAGACAAGGCAG
ACCUGAGACUGAUCUACCUGGCACUGGCACAC
AUGAUCAAGUUCAGAGGACACUUCCUGAUCGA
AGGAGACCUGAACCCGGACAACAGCGACGUCG
ACAAGCUGUUCAUCCAGCUGGUCCAGACAUAC
AACCAGCUGUUCGAAGAAAACCCGAUCAACGC
AAGCGGAGUCGACGCAAAGGCAAUCCUGAGCG
CAAGACUGAGCAAGAGCAGAAGACUGGAAAAC
CUGAUCGCACAGCUGCCGGGAGAAAAGAAGAA
CGGACUGUUCGGAAACCUGAUCGCACUGAGCC
UGGGACUGACACCGAACUUCAAGAGCAACUUC
GACCUGGCAGAAGACGCAAAGCUGCAGCUGAG
CAAGGACACAUACGACGACGACCUGGACAACC
UGCUGGCACAGAUCGGAGACCAGUACGCAGAC
CUGUUCCUGGCAGCAAAGAACCUGAGCGACGC
AAUCCUGCUGAGCGACAUCCUGAGAGUCAACA
CAGAAAUCACAAAGGCACCGCUGAGCGCAAGC
AUGAUCAAGAGAUACGACGAACACCACCAGGA
CCUGACACUGCUGAAGGCACUGGUCAGACAGC
AGCUGCCGGAAAAGUACAAGGAAAUCUUCUUC
GACCAGAGCAAGAACGGAUACGCAGGAUACAU
CGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAAUUCUACA
AGUUCAUCAAGCCGAUCCUGGAAAAGAUGGAC
GGAACAGAAGAACUGCUGGUCAAGCUGAACAG
AGAAGACCUGCUGAGAAAGCAGAGAACAUCG

ACAACGGAAGCAUCCCGCACCAGAUCCACCU
GGAGAACUGCACGCAAUCCUGAGAAGACAGGA
AGACUUCUACCCGUUCCUGAAGGACAACAGAG
AAAAGAUCGAAAAGAUCUGACAUUCAGAAUC
CCGUACUACGUCGGACCGCUGGCAAGAGGAAA
CAGCAGAUUCGCAUGGAUGACAAGAAAGAGCG
AAGAAACAAUCACACCGUGGAACUUCGAAGAA
GUCGUCGACAAGGGAGCAAGCGCACAGAGCUU
CAUCGAAAGAAUGACAAACUUCGACAAGAACC
UGCCGAACGAAAAGGUCCUGCCGAAGCACAGC
CUGCUGUACGAAUACUUCACAGUCUACAACGA
ACUGACAAAGGUCAAGUACGUCACAGAAGGAA
UGAGAAAGCCGGCAUUCCUGAGCGGAGAACAG
AAGAAGGCAAUCGUCGACCUGCUGUUCAAGAC
AAACAGAAAGGUCACAGUCAAGCAGCUGAAGG
AAGACUACUUCAAGAAGAUCGAAUGCUUCGAC
AGCGUCGAAAUCAGCGGAGUCGAAGACAGAUU
CAACGCAAGCCUGGGAACAUACCACGACCUGC
UGAAGAUCAUCAAGGACAAGGACUUCCUGGAC
AACGAAGAAAACGAAGACAUCCUGGAAGACAU
CGUCCUGACACUGACACUGUUCGAAGACAGAG
AAAUGAUCGAAGAAAGACUGAAGACAUACGCA
CACCUGUUCGACGACAAGGUCAUGAAGCAGCU
GAAGAGAAGAAGAUACACAGGAUGGGGAAGA
CUGAGCAGAAAGCUGAUCAACGGAAUCAGAGA
CAAGCAGAGCGGAAAGACAAUCCUGGACUUCC
UGAAGAGCGACGGAUUCGCAAACAGAAACUUC
AUGCAGCUGAUCCACGACGACAGCCUGACAUU
CAAGGAAGACAUCCAGAAGGCACAGGUCAGCG
GACAGGGAGACAGCCUGCACGAACACAUCGCA
AACCUGGCAGGAAGCCCGGCAAUCAAGAAGGG
AAUCCUGCAGACAGUCAAGGUCGUCGACGAAC
UGGUCAAGGUCAUGGGAAGACACAAGCCGGAA
AACAUUCGUCAUCGAAAUGGCAAGAGAAAACCA
GACAACACAGAAGGGACAGAAGAACAGCAGAG

AAAGAAUGAAGAGAAUCGAAGAAGGAAUCA
GGAACUGGGAAGCCAGAUCUGAAGGAACACC
CGGUCGAAAACACACAGCUGCAGAACGAAAAG
CUGUACCUGUACUACCUGCAGAACGGAAGAGA
CAUGUACGUCGACCAGGAACUGGACAUCAACA
GACUGAGCGACUACGACGUCGACGCAAUCGUC
CCGCAGAGCUUCCUGAAGGACGACAGCAUCGA
CAACAAGGUCCUGACAAGAAGCGACAAGAACA
GAGGAAAGAGCGACAACGUCCCGAGCGAAGAA
GUCGUCAAGAAGAUGAAGAACUACUGGAGACA
GCUGCUGAACGCAAAGCUGAUCACACAGAGAA
AGUUCGACAACCUGACAAAGGCAGAGAGAGGA
GGACUGAGCGAACUGGACAAGGCAGGAUUCAU
CAAGAGACAGCUGGUCGAAACAAGACAGAUCA
CAAAGCACGUCGCACAGAUCUGGACAGCAGA
AUGAACACAAAGUACGACGAAAACGACAAGCU
GAUCAGAGAAGUCAAGGUCAUCACACUGAAGA
GCAAGCUGGUCAGCGACUUCAGAAAGGACUUC
CAGUUCUACAAGGUCAGAGAAAUCAACAACUA
CCACCACGCACACGACGCAUACCUGAACGCAG
UCGUCGGAACAGCACUGAUCAAGAAGUACCCG
AAGCUGGAAAGCGAAUUCGUCUACGGAGACUA
CAAGGUCUACGACGUCAGAAAGAUGAUCGCAA
AGAGCGAACAGGAAAUCGGAAAGGCAACAGCA
AAGUACUUCUUCUACAGCAACAUCAUGAACU
CUUCAAGACAGAAAUCACACUGGCAAACGGAG
AAAUCAGAAAGAGACCGCUGAUCGAAACAAC
GGAGAAACAGGAGAAAUCGUCUGGGACAAGGG
AAGAGACUUCGCAACAGUCAGAAAGGUCCUGA
GCAUGCCGCAGGUCAACAUCGUCAAGAAGACA
GAAGUCCAGACAGGAGGAUUCAGCAAGGAAAG
CAUCCUGCCGAAGAGAAACAGCGACAAGCUGA
UCGCAAGAAAGAAGGACUGGGACCCGAAGAAG
UACGGAGGAUUCGACAGCCCGACAGUCGCAUA
CAGCGUCCUGGUCGUCGCAAAGGUCGAAAAGG

	<p>GAAAGAGCAAGAAGCUGAAGAGCGUCAAGGAA CUGCUGGGAAUCACAAUCAUGGAAAGAAGCAG CUUCGAAAAGAACCCGAUCGACUCCUGGAAG CAAAGGGAUACAAGGAAGUCAAGAAGGACCUG AUCAUCAAGCUGCCGAAGUACAGCCUGUUCGA ACUGGAAAACGGAAGAAAGAGAAUGCUGGCAA GCGCAGGAGAACUGCAGAAGGGAAACGAACUG GCACUGCCGAGCAAGUACGUCAACUCCUGUA CCUGGCAAGCCACUACGAAAAGCUGAAGGGAA GCCCCGGAAGACAACGAACAGAAGCAGCUGUUC GUCGAACAGCACAAAGCACUACCUGGACGAAAU CAUCGAACAGAUCAGCGAAUUCAGCAAGAGAG UCAUCCUGGCAGACGCAAACCUGGACAAGGUC CUGAGCGCAUACAACAAGCACAGAGACAAGCC GAUCAGAGAACAGGCAGAAAACAUCAUCCACC UGUUCACACUGACAAACCUGGGAGCACCGGCA GCAUUCAAGUACUUCGACACAACAUCGACAG AAAGAGAUACACAAGCACAAAGGAAGUCCUGG ACGCAACACUGAUCCACCAGAGCAUCACAGGA CUGUACGAAACAAGAAUCGACCUGAGCCAGCU GGGAGGAGACGGAGGAGGAAGCCCGAAGAAGA AGAGAAAGGUCUAG</p>	
<p>Кодирующая мРНК последовательность Cas 9, включающая минимальные кодоны уридина (без старт или стоп кодонов, уместных для включения в последовательность, кодирующую гибридный белок)</p>	<p>GACAAGAAGUACAGCAUCGGACUGGACAUCGG AACAAACAGCGUCGGAUGGGCAGUCAUCACAG ACGAAUACAAGGUCCCGAGCAAGAAGUUCAAG GUCCUGGGAAACACAGACAGACACAGCAUCAA GAAGAACCUGAUUCGGAGCACUGCUGUUCGACA GCGGAGAAACAGCAGAAGCAACAAGACUGAAG AGAACAGCAAGAAGAAGAUACACAAGAAGAAA GAACAGAAUCUGCUACCUGCAGGAAAUCUUCA GCAACGAAAUGGCAAAGGUCGACGACAGCUUC UCCACAGACUGGAAGAAAGCUUCCUGGUCGA AGAAGACAAGAAGCACGAAAGACACCCGAUCU UCGGAAACAUCGUCGACGAAGUCGCAUACCAC GAAAAGUACCCGACAAUCUACCACCUGAGAAA</p>	210

GAAGCUGGUCGACAGCACAGACAAGGCAGACC
UGAGACUGAUCUACCUGGCACUGGCACACAUG
AUCAAGUUCAGAGGACACUUCCUGAUCGAAGG
AGACCUGAACCCGGACAACAGCGACGUCGACA
AGCUGUUCAUCCAGCUGGUCCAGACAUACAAC
CAGCUGUUCGAAGAAAACCCGAUCAACGCAAG
CGGAGUCGACGCAAAGGCAAUCCUGAGCGCAA
GACUGAGCAAGAGCAGAAGACUGGAAAACCUG
AUCGCACAGCUGCCGGGAGAAAAGAAGAACGG
ACUGUUCGGAAACCUGAUCGCACUGAGCCUGG
GACUGACACCGAACUUCAAGAGCAACUUCGAC
CUGGCAGAAGACGCAAAGCUGCAGCUGAGCAA
GGACACAUACGACGACGACCUGGACAACCUGC
UGGCACAGAUCCGGAGACCAGUACGCAGACCUG
UCCUGGCAGCAAAGAACCUGAGCGACGCAAU
CCUGCUGAGCGACAUCCUGAGAGUCAACACAG
AAAUCACAAAGGCACCGCUGAGCGCAAGCAUG
AUCAAGAGAUACGACGAACACCACCAGGACCU
GACACUGCUGAAGGCACUGGUCAGACAGCAGC
UGCCGGAAAAGUACAAGGAAAUCUUCUUCGAC
CAGAGCAAGAACGGAUACGCAGGAUACAUCGA
CGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAAUUCUACAAGU
UCAUCAAGCCGAUCCUGGAAAAGAUGGACGGA
ACAGAAGAACUGCUGGUCAAGCUGAACAGAGA
AGACCUGCUGAGAAAGCAGAGAACAUCGACA
ACGGAAGCAUCCCGCACCAGAUCACCUGGGA
GAACUGCACGCAAUCCUGAGAAGACAGGAAGA
CUUCUACCCGUUCCUGAAGGACAACAGAGAAA
AGAUCGAAAAGAUCUGACAUCAGAAUCCCG
UACUACGUCGGACCGCUGGCAAGAGGAAACAG
CAGAUUCGCAUGGAUGACAAGAAAGAGCGAAG
AAACAUCACACCGUGGAACUUCGAAGAAGUC
GUCGACAAGGGAGCAAGCGCACAGAGCUUCAU
CGAAAGAAUGACAAACUUCGACAAGAACCUGC
CGAACGAAAAGGUCCUGCCGAAGCACAGCCUG

CUGUACGAAUACUUCACAGUCUACAACGAACU
GACAAAGGUCAAGUACGUCACAGAAGGAAUGA
GAAAGCCGGCAUUCCUGAGCGGAGAACAGAAG
AAGGCAAUCGUCGACCUGCUGUUCAAGACAAA
CAGAAAGGUCACAGUCAAGCAGCUGAAGGAAG
ACUACUUCAAGAAGAUCGAAUGCUUCGACAGC
GUCGAAAUCAGCGGAGUCGAAGACAGAUUCA
CGCAAGCCUGGGAACAUAACCACGACCUGCUGA
AGAUCAUCAAGGACAAGGACUUCCUGGACAAC
GAAGAAAACGAAGACAUCCUGGAAGACAUCGU
CCUGACACUGACACUGUUCGAAGACAGAGAAA
UGAUCGAAGAAAGACUGAAGACAUACGCACAC
CUGUUCGACGACAAGGUCAUGAAGCAGCUGAA
GAGAAGAAGAUACACAGGAUGGGGAAGACUG
AGCAGAAAGCUGAUAACGGAAUCAGAGACAA
GCAGAGCGGAAAGACAAUCCUGGACUUCCUGA
AGAGCGACGGAUUCGCAAACAGAAACUUCAUG
CAGCUGAUCCACGACGACAGCCUGACAUUCA
GGAAGACAUCCAGAAGGCACAGGUCAGCGGAC
AGGGAGACAGCCUGCACGAACACAUCGCAAAC
CUGGCAGGAAGCCCGGCAAUCAAGAAGGGAAU
CCUGCAGACAGUCAAGGUCGUCGACGAACUGG
UCAAGGUCAUGGGAAGACACAAGCCGGAAAAC
AUCGUCAUCGAAAUGGCAAGAGAAAACCAGAC
AACACAGAAGGGACAGAAGAACAGCAGAGAAA
GAAUGAAGAGAAUCGAAGAAGGAAUCAAGGA
ACUGGGAAGCCAGAUCCUGAAGGAACACCCGG
UCGAAAACACACAGCUGCAGAACGAAAAGCUG
UACCUGUACUACCUGCAGAACGGAAGAGACAU
GUACGUCGACCAGGAACUGGACAUCAACAGAC
UGAGCGACUACGACGUCGACCACAUCGUCCG
CAGAGCUUCCUGAAGGACGACAGCAUCGACAA
CAAGGUCCUGACAAGAAGCGACAAGAACAGAG
GAAAGAGCGACAACGUCCCGAGCGAAGAAGUC
GUCAAGAAGAUGAAGAACUACUGGAGACAGCU

GCUGAACGCAAAGCUGAUCACACAGAGAAAGU
UCGACAACCUGACAAAGGCAGAGAGAGGAGGA
CUGAGCGAACUGGACAAGGCAGGAUUCAUCA
GAGACAGCUGGUCGAAACAAGACAGAUCACAA
AGCACGUCGCACAGA UCCUGGACAGCAGAAUG
AACACAAAGUACGACGAAAACGACAAGCUGAU
CAGAGAAGUCAAGGUCAUCACACUGAAGAGCA
AGCUGGUCAGCGACUUCAGAAAGGACUCCAG
UUCUACAAGGUCAGAGAAAUCAACAACUACCA
CCACGCACACGACGCAUACCUGAACGCAGUCG
UCGGAACAGCACUGAUCAAGAAGUACCCGAAG
CUGGAAAGCGAAUUCGUCUACGGAGACUACAA
GGUCUACGACGUCAGAAAGAUGAUCGCAAAGA
GCGAACAGGAAAUCGGAAAGGCAACAGCAAAG
UACUUCUUCUACAGCAACAUCAUGAACUUCU
CAAGACAGAAAUCACACUGGCAAACGGAGAAA
UCAGAAAGAGACCGCUGAUCGAAACAAACGGA
GAAACAGGAGAAAUCGUCUGGGACAAGGGAAG
AGACUUCGCAACAGUCAGAAAGGUCCUGAGCA
UGCCGCAGGUCAACAUCGUCAAGAAGACAGAA
GUCCAGACAGGAGGAUUCAGCAAGGAAAGCAU
CCUGCCGAAGAGAAACAGCGACAAGCUGAUCG
CAAGAAAGAAGGACUGGGACCCGAAGAAGUAC
GGAGGAUUCGACAGCCGACAGUCGCAUACAG
CGUCCUGGUCGUCGCAAAGGUCGAAAAGGGAA
AGAGCAAGAAGCUGAAGAGCGUCAAGGAACUG
CUGGGAAUCACAAUCAUGGAAAGAAGCAGCUU
CGAAAAGAACCCGAUCGACUCCUGGAAGCAA
AGGGAUACAAGGAAGUCAAGAAGGACCUGAUC
AUCAAGCUGCCGAAGUACAGCCUGUUCGAACU
GGAAAACGGAAGAAAGAGAAUGCUGGCAAGCG
CAGGAGAACUGCAGAAGGGAAACGAACUGGCA
CUGCCGAGCAAGUACGUCAACUCCUGUACCU
GGCAAGCCACUACGAAAAGCUGAAGGGAAGCC
CGGAAGACAACGAACAGAAGCAGCUGUUCGUC

	<p>GAACAGCACAAGCACUACCUGGACGAAAUCAU CGAACAGAUCAGCGAAUUCAGCAAGAGAGUCA UCCUGGCAGACGCAAACCUGGACAAGGUCCUG AGCGCAUACAACAAGCACAGAGACAAGCCGAU CAGAGAACAGGCAGAAAACAUCAUCCACCUGU UCACACUGACAAACCUGGGAGCACCCGGCAGCA UUCAAGUACUUCGACACAACAAUCGACAGAAA GAGAUACACAAGCACAAAGGAAGUCCUGGACG CAACACUGAUCCACCAGAGCAUCACAGGACUG UACGAAACAAGAAUCGACCUGAGCCAGCUGGG AGGAGACGGAGGAGGAAGCCCGAAGAAGAAGA GAAAGGUC</p>	
<p>Cas 9 никаза, кодирующая последовательность, используя минимальные кодоны уридина (без старт или стоп кодонов, уместные для включения в последовательность, кодирующую гибридный белок)</p>	<p>GACAAGAAGUACAGCAUCGGACUGGCAAUCGG AACAAACAGCGUCGGAUGGGCAGUCAUCACAG ACGAAUACAAGGUCCCGAGCAAGAAGUUCAAG GUCCUGGGAAACACAGACAGACACAGCAUCAA GAAGAACCUGAUCCGGAGCACUGCUGUUCGACA GCGGAGAAACAGCAGAAGCAACAAGACUGAAG AGAACAGCAAGAAGAAGAUACACAAGAAGAAA GAACAGAAUCUGCUACCUGCAGGAAAUCUUCA GCAACGAAAUGGCAAAGGUCGACGACAGCUUC UCCACAGACUGGAAGAAAGCUUCCUGGUCGA AGAAGACAAGAAGCACGAAAGACACCCGAUCU UCGGAAACAUCGUCGACGAAGUCGCAUACCAC GAAAAGUACCCGACAUCUACCACCUGAGAAA GAAGCUGGUCGACAGCACAGACAAGGCAGACC UGAGACUGAUCUACCUGGCACUGGCACACAUG AUCAAGUUCAGAGGACACUCCUGAUCGAAGG AGACCUGAACCCGGACAACAGCGACGUCGACA AGCUGUUCAUCCAGCUGGUCCAGACAUACAAC CAGCUGUUCGAAGAAAACCCGAUCAACGCAAG CGGAGUCGACGCAAAGGCAAUCCUGAGCGCAA GACUGAGCAAGAGCAGAAGACUGGAAAACCUG AUCGCACAGCUGCCGGGAGAAAAGAAGAACGG ACUGUUCGGAAACCUGAUCGCACUGAGCCUGG</p>	<p>211</p>

GACUGACACCGAACUUCAAGAGCAACUUCGAC
CUGGCAGAAGACGCAAAGCUGCAGCUGAGCAA
GGACACAUACGACGACGACCUGGACAACCUGC
UGGCACAGAUCCGGAGACCAGUACGCAGACCUG
UCCUGGCAGCAAAGAACCUGAGCGACGCAAU
CCUGCUGAGCGACAUCCUGAGAGUCAACACAG
AAAUCACAAAGGCACCGCUGAGCGCAAGCAUG
AUCAAGAGAUACGACGAACACCACCAGGACCU
GACACUGCUGAAGGCACUGGUCAGACAGCAGC
UGCCGGAAAAGUACAAGGAAAUCUUCUUCGAC
CAGAGCAAGAACGGAUACGCAGGAUACAUCGA
CGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAAUUCUACAAGU
UCAUCAAGCCGAUCCUGGAAAAGAUGGACGGA
ACAGAAGAACUGCUGGUCAAGCUGAACAGAGA
AGACCUGCUGAGAAAGCAGAGAACAUCGACA
ACGGAAGCAUCCCGCACCAGAUCCACCUGGGA
GAACUGCACGCAAUCCUGAGAAGACAGGAAGA
CUUCUACCCGUUCCUGAAGGACAACAGAGAAA
AGAUCGAAAAGA UCCUGACAUCAGAAUCCCG
UACUACGUCGGACCGCUGGCAAGAGGAAACAG
CAGAUUCGCAUGGAUGACAAGAAAGAGCGAAG
AAACAAUCACACCGUGGAACUUCGAAGAAGUC
GUCGACAAGGGAGCAAGCGCACAGAGCUUCAU
CGAAAGAAUGACAAACUUCGACAAGAACCUGC
CGAACGAAAAGGUCCUGCCGAAGCACAGCCUG
CUGUACGAAUACUUCACAGUCUACAACGAACU
GACAAAGGUCAAGUACGUCACAGAAGGAAUGA
GAAAGCCGGCAUCCUGAGCGGAGAACAGAAG
AAGGCAAUCGUCGACCUGCUGUUCAAGACAAA
CAGAAAGGUCACAGUCAAGCAGCUGAAGGAAG
ACUACUUCAAGAAGAUCGAAUGCUUCGACAGC
GUCGAAAUCAGCGGAGUCGAAGACAGAUUCA
CGCAAGCCUGGGAACAUAACCACGACCUGCUGA
AGAUCAUCAAGGACAAGGACUCCUGGACAAC
GAAGAAAACGAAGACAUCCUGGAAGACAUCGU

CCUGACACUGACACUGUUCGAAGACAGAGAAA
UGAUCGAAGAAAGACUGAAGACAUACGCACAC
CUGUUCGACGACAAGGUCAUGAAGCAGCUGAA
GAGAAGAAGAUACACAGGAUGGGGAAGACUG
AGCAGAAAGCUGAUCAACGGAAUCAGAGACAA
GCAGAGCGGAAAGACAAUCCUGGACUCCUGA
AGAGCGACGGAUUCGCAAACAGAAACUUCAUG
CAGCUGAUCCACGACGACAGCCUGACAUCUCAA
GGAAGACAUCCAGAAGGCACAGGUCAGCGGAC
AGGGAGACAGCCUGCACGAACACAUCGCAAAC
CUGGCAGGAAGCCCGGCAAUCAAGAAGGGAAU
CCUGCAGACAGUCAAGGUCGUCGACGAACUGG
UCAAGGUCAUGGGAAGACACAAGCCGGAAAAC
AUCGUCAUCGAAAUGGCAAGAGAAAACCAGAC
AACACAGAAGGGACAGAAGAACAGCAGAGAAA
GAAUGAAGAGAAUCGAAGAAGGAAUCAAGGA
ACUGGGAAGCCAGAUCCUGAAGGAACACCCGG
UCGAAAACACACAGCUGCAGAACGAAAAGCUG
UACCUGUACUACCUGCAGAACGGAAGAGACAU
GUACGUCGACCAGGAACUGGACAUCAACAGAC
UGAGCGACUACGACGUCGACCACAUCGUCCCG
CAGAGCUUCCUGAAGGACGACAGCAUCGACAA
CAAGGUCCUGACAAGAAGCGACAAGAACAGAG
GAAAGAGCGACAACGUCCCGAGCGAAGAAGUC
GUCAAGAAGAUGAAGAACUACUGGAGACAGCU
GCUGAACGCAAAGCUGAUCACACAGAGAAAGU
UCGACAACCUGACAAAGGCAGAGAGAGGAGGA
CUGAGCGAACUGGACAAGGCAGGAUUCAUCA
GAGACAGCUGGUCGAAACAAGACAGAUCACAA
AGCACGUCGCACAGA UCCUGGACAGCAGAAUG
AACACAAAGUACGACGAAAACGACAAGCUGAU
CAGAGAAGUCAAGGUCAUCACACUGAAGAGCA
AGCUGGUCAGCGACUUCAGAAAGGACUCCAG
UUCUACAAGGUCAGAGAAAUCAACAACUACCA
CCACGCACACGACGCAUACCUGAACGCAGUCG

UCGGAACAGCACUGAUCAAGAAGUACCCGAAG
CUGGAAAGCGAAUUCGUCUACGGAGACUACAA
GGUCUACGACGUCAGAAAGAUGAUCGCAAAGA
GCGAACAGGAAAUCGGAAAGGCAACAGCAAAG
UACUUCUUCUACAGCAACAUCAUGAACUUCUU
CAAGACAGAAAUCACACUGGCAAACGGAGAAA
UCAGAAAGAGACCGCUGAUCGAAACAAACGGA
GAAACAGGAGAAAUCGUCUGGGACAAGGGAAAG
AGACUUCGCAACAGUCAGAAAGGUCCUGAGCA
UGCCGCAGGUCAACAUCGUCAAGAAGACAGAA
GUCCAGACAGGAGGAUUCAGCAAGGAAAGCAU
CCUGCCGAAGAGAAACAGCGACAAGCUGAUCG
CAAGAAAGAAGGACUGGGACCCGAAGAAGUAC
GGAGGAUUCGACAGCCCGACAGUCGCAUACAG
CGUCCUGGUCGUCGCAAAGGUCGAAAAGGGAA
AGAGCAAGAAGCUGAAGAGCGUCAAGGAACUG
CUGGGAAUCACAAUCAUGGAAAGAAGCAGCUU
CGAAAAGAACCCGAUCGACUUCUGGAAGCAA
AGGGAUACAAGGAAGUCAAGAAGGACCUGAUC
AUCAAGCUGCCGAAGUACAGCCUGUUCGAACU
GGAAAACGGAAGAAAGAGAAUGCUGGCAAGCG
CAGGAGAACUGCAGAAGGGAAACGAACUGGCA
CUGCCGAGCAAGUACGUCAACUUCUGUACCU
GGCAAGCCACUACGAAAAGCUGAAGGGAAGCC
CGGAAGACAACGAACAGAAGCAGCUGUUCGUC
GAACAGCACAAGCACUACCUGGACGAAAUCAU
CGAACAGAUCAGCGAAUUCAGCAAGAGAGUCA
UCCUGGCAGACGCAAACCUGGACAAGGUCCUG
AGCGCAUACAACAAGCACAGAGACAAGCCGAU
CAGAGAACAGGCAGAAAACAUCAUCCACCUGU
UCACACUGACAAACCUGGGAGCACCGGCAGCA
UUCAAGUACUUCGACACAACAUCGACAGAAA
GAGAUACACAAGCACAAAGGAAGUCCUGGACG
CAACACUGAUCCACCAGAGCAUCACAGGACUG
UACGAAACAAGAAUCGACCUGAGCCAGCUGGG

	AGGAGACGGAGGAGGAAGCCCGAAGAAGAAGA GAAAGGUC	
<p>Последовательность кодирующая dCas 9, включающая минимальные кодоны уридина (без старт или стоп кодонов, уместные для включения в последовательность, кодирующую гибридный белок)</p>	<p>GACAAGAAGUACAGCAUCGGACUGGCAAUCGG AACAAACAGCGUCGGAUGGGCAGUCAUCACAG ACGAAUACAAGGUCCCGAGCAAGAAGUUCAAG GUCCUGGGAAACACAGACAGACACAGCAUCAA GAAGAACCUGAUCGGAGCACUGCUGUUCGACA GCGGAGAAACAGCAGAAGCAACAAGACUGAAG AGAACAGCAAGAAGAAGAUACACAAGAAGAAA GAACAGAAUCUGCUACCUGCAGGAAAUCUUCA GCAACGAAAUGGCAAAGGUCGACGACAGCUUC UUCCACAGACUGGAAGAAAGCUUCCUGGUCGA AGAAGACAAGAAGCACGAAAGACACCCGAUCU UCGGAACAUCGUCGACGAAGUCGCAUACCAC GAAAAGUACCCGACAAUCUACCACCUGAGAAA GAAGCUGGUCGACAGCACAGACAAGGCAGACC UGAGACUGAUCUACCUGGCACUGGCACACAUG AUCAAGUUCAGAGGACACUUCUGAUCGAAGG AGACCUGAACCCGGACAACAGCGACGUCGACA AGCUGUUCAUCCAGCUGGUCCAGACAUACAAC CAGCUGUUCGAAGAAAACCCGAUCAACGCAAG CGGAGUCGACGCAAAGGCAAUCCUGAGCGCAA GACUGAGCAAGAGCAGAAGACUGGAAAACCUG AUCGCACAGCUGCCGGGAGAAAAGAAGACGG ACUGUUCGGAAACCUGAUCGCACUGAGCCUGG GACUGACACCGAACUUCAAGAGCAACUUCGAC CUGGCAGAAGACGCAAAGCUGCAGCUGAGCAA GGACACAUACGACGACGACCUGGACAACCUGC UGGCACAGAUCCGGAGACCAGUACGCAGACCUG UCCUGGCAGCAAAGAACCUAGAGCGACGCAAU CCUGCUGAGCGACAUCUGAGAGUCAACACAG AAAUCACAAAGGCACCGCUGAGCGCAAGCAUG AUCAAGAGAUACGACGAACACCACCAGGACCU GACACUGCUGAAGGCACUGGUCAGACAGCAGC UGCCGGAAAAGUACAAGGAAAUCUUCUUCGAC</p>	212

CAGAGCAAGAACGGAUACGCAGGAUACAUCGA
CGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAAUUCUACAAGU
UCAUCAAGCCGAUCCUGGAAAAGAUGGACGGA
ACAGAAGAACUGCUGGUCAAGCUGAACAGAGA
AGACCUGCUGAGAAAGCAGAGAACAUCGACA
ACGGAAGCAUCCCGCACCCAGAUCCACCUGGGA
GAACUGCACGCAAUCCUGAGAAGACAGGAAGA
CUUCUACCCGUUCCUGAAGGACAACAGAGAAA
AGAUCGAAAAGA UCCUGACAUCAGAAUCCCG
UACUACGUCGGACCGCUGGCAAGAGGAAACAG
CAGAUUCGCAUGGAUGACAAGAAAGAGCGAAG
AAACAUCACACCGUGGAACUUCGAAGAAGUC
GUCGACAAGGGAGCAAGCGCACAGAGCUUCAU
CGAAAGAAUGACAAACUUCGACAAGAACCUGC
CGAACGAAAAGGUCCUGCCGAAGCACAGCCUG
CUGUACGAAUACUUCACAGUCUACAACGAACU
GACAAAGGUCAAGUACGUCACAGAAGGAAUGA
GAAAGCCGGCAUUCUGAGCGGAGAACAGAAG
AAGGCAAUCGUCGACCUGCUGUUCAAGACAAA
CAGAAAGGUCACAGUCAAGCAGCUGAAGGAAG
ACUACUUCAAGAAGAUCGAAUGCUUCGACAGC
GUCGAAAUCAGCGGAGUCGAAGACAGAUUCA
CGCAAGCCUGGGAACAUACCACGACCUGCUGA
AGAUCAUCAAGGACAAGGACUCCUGGACAAC
GAAGAAAACGAAGACAUCCUGGAAGACAUCGU
CCUGACACUGACACUGUUCGAAGACAGAGAAA
UGAUCGAAGAAAGACUGAAGACAUACGCACAC
CUGUUCGACGACAAGGUCAUGAAGCAGCUGAA
GAGAAGAAGAUACACAGGAUGGGGAAGACUG
AGCAGAAAGCUGAUCAACGGAAUCAGAGACAA
GCAGAGCGGAAAGACAAUCCUGGACUCCUGA
AGAGCGACGGAUUCGCAAACAGAAACUUCAUG
CAGCUGAUCCACGACGACAGCCUGACAUCUCAA
GGAAGACAUC CAGAAGGCACAGGUCAGCGGAC
AGGGAGACAGCCUGCACGAACACAUCGCAAAC

CUGGCAGGAAGCCCGGCAAUCAAGAAGGGAAU
CCUGCAGACAGUCAAGGUCGUCGACGAACUGG
UCAAGGUCAUGGGAAGACACAAGCCGGAAAAC
AUCGUCAUCGAAAUGGCAAGAGAAAACCAGAC
AACACAGAAGGGACAGAAGAACAGCAGAGAAA
GAAUGAAGAGAAUCGAAGAAGGAAUCAAGGA
ACUGGGAAGCCAGAUCCUGAAGGAACACCCGG
UCGAAAACACACAGCUGCAGAACGAAAAGCUG
UACCUGUACUACCUGCAGAACGGAAGAGACAU
GUACGUCGACCAGGAACUGGACAUCAACAGAC
UGAGCGACUACGACGUCGACGCAAUCGUCCG
CAGAGCUUCCUGAAGGACGACAGCAUCGACAA
CAAGGUCCUGACAAGAAGCGACAAGAACAGAG
GAAAGAGCGACAACGUCCCGAGCGAAGAAGUC
GUCAAGAAGAUGAAGAACUACUGGAGACAGCU
GCUGAACGCAAAGCUGAUCACACAGAGAAAGU
UCGACAACCUGACAAAGGCAGAGAGAGGAGGA
CUGAGCGAACUGGACAAGGCAGGAUUUCAUCAA
GAGACAGCUGGUCGAAACAAGACAGAUCACAA
AGCACGUCGCACAGA UCCUGGACAGCAGAAUG
AACACAAAGUACGACGAAAACGACAAGCUGAU
CAGAGAAGUCAAGGUCAUCACACUGAAGAGCA
AGCUGGUCAGCGACUUCAGAAAGGACU UCCAG
UUCUACAAGGUCAGAGAAAUCAACAACUACCA
CCACGCACACGACGCAUACCUGAACGCAGUCG
UCGGAACAGCACUGAUCAAGAAGUACCCGAAG
CUGGAAAGCGAAUUCGUCUACGGAGACUACAA
GGUCUACGACGUCAGAAAGAUGAUCGCAAAGA
GCGAACAGGAAAUCGGAAAGGCAACAGCAAAG
UACUUCUUCUACAGCAACAUCAUGAACUUCUU
CAAGACAGAAAUCACACUGGCAAACGGAGAAA
UCAGAAAGAGACCCGCUGAUCGAAACAAACGGA
GAAACAGGAGAAAUCGUCUGGGACAAGGGAAG
AGACUUCGCAACAGUCAGAAAGGUCCUGAGCA
UGCCGCAGGUCAACAUCGUCAAGAAGACAGAA

	<p>GUCCAGACAGGAGGAUUCAGCAAGGAAAGCAU CCUGCCGAAGAGAAACAGCGACAAGCUGAUCG CAAGAAAGAAGGACUGGGACCCGAAGAAGUAC GGAGGAUUCGACAGCCCGACAGUCGCAUACAG CGUCCUGGUCGUCGCAAAGGUCGAAAAGGGAA AGAGCAAGAAGCUGAAGAGCGUCAAGGAACUG CUGGGAAUCACAAUCAUGGAAAGAAGCAGCUU CGAAAAGAACCCGAUCGACUUCCUGGAAGCAA AGGGAUACAAGGAAGUCAAGAAGGACCUGAUC AUCAAGCUGCCGAAGUACAGCCUGUUCGAACU GGAAAACGGAAGAAAGAGAAUGCUGGCAAGCG CAGGAGAACUGCAGAAGGGAAACGAACUGGCA CUGCCGAGCAAGUACGUCAACUUCCUGUACCU GGCAAGCCACUACGAAAAGCUGAAGGGAAGCC CGGAAGACAACGAACAGAAGCAGCUGUUCGUC GAACAGCACAAGCACUACCUGGACGAAAUCAU CGAACAGAUCAGCGAAUUCAGCAAGAGAGUCA UCCUGGCAGACGCAAACCUGGACAAGGUCCUG AGCGCAUACAACAAGCACAGAGACAAGCCGAU CAGAGAACAGGCAGAAAACAUCAUCCACCUGU UCACACUGACAAACCUGGGAGCACCCGGCAGCA UUCAAGUACUUCGACACAACAUCGACAGAAA GAGAUACACAAGCACAAAGGAAGUCCUGGACG CAACACUGAUCCACCAGAGCAUCACAGGACUG UACGAAACAAGAAUCGACCUGAGCCAGCUGGG AGGAGACGGAGGAGGAAGCCCGAAGAAGAAGA GAAAGGUC</p>	
<p>Аминокислотная последовательность Cas 9 (без NLS)</p>	<p>MDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKV LGNTDRHSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTAR RRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSSFFHRLEES FLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLR KKLVDSTDKADLRLIYLALAHMIKFRGHFLIEGDL NPDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAK AILSARLSKSRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALS LGLTPNFKSNFDLAEDAQLSKDQYDDDLNLL</p>	<p>213</p>

	<p>AQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKA PLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEI FFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDG TEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELH AILRRQEDFYFPLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLA RGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEEVVDKGASAQS FIERMTNFDKNLPNEKVLPHSLLYEYFTVYNELT KVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKV TVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTY HDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDRE MIEERLKYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLS RKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANRNFMLIH DDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAI KKGILQTVKVVDELVKVMGRHKPENIVIAMAREN QTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQILKEHPVE NTQLQNEKLYLYLQNGRDMYVDQELDINRLSD YDVDHIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDN VPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTK AERGGELSEDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDS RMNTKYDENDKLIREVKVITLKSCLVSDFRKDFQF YK VREINNYHHAHDAYLNAVVGTA LIKKYPKLES EFVYGDYK VYDVRKMIAKSEQEIGKATAKYFFYS NIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDK GRDFATVRKVL SMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESIL PKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLV VAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIMERSSEKPNIDF LEAKGYKEVKKDLI IKLPKYSLFELENGRKRMLAS AGELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLGKSPE DNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVLADAN LDKVL SAYNKHRDKPIREQAENIHLFTLTNLGAP AAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVL DATLIHQ SITGLYE TRIDLSQLGGD</p>	
<p>ORF мPHK Cas 9, кодирующая SEQ ID №: 213 с использованием</p>	<p>AUGGACAAGAAGUACAGCAUCGGACUGGACAU CGGAACAAACAGCGUCGGAUGGGCAGUCAUCA CAGACGAAUACAAGGUCCCGAGCAAGAAGUUC</p>	<p>214</p>

минимальных кодонов
уридина, без старт и
стоп кодонов

AAGGUCCUGGGAAACACAGACAGACACAGCAU
CAAGAAGAACCUGAUCGGAGCACUGCUGUUCG
ACAGCGGAGAAACAGCAGAAGCAACAAGACUG
AAGAGAACAGCAAGAAGAAGAUACACAAGAAG
AAAGAACAGAAUCUGCUACCUGCAGGAAAUCU
UCAGCAACGAAAUGGCAAAGGUCGACGACAGC
UUCUCCACAGACUGGAAGAAAGCUUCCUGGU
CGAAGAAGACAAGAAGCACGAAAGACACCCGA
UCUUCGGAAACAUCGUCGACGAAGUCGCAUAC
CACGAAAAGUACCCGACAAUCUACCACCUGAG
AAAGAAGCUGGUCGACAGCACAGACAAGGCAG
ACCUGAGACUGAUCUACCUGGCACUGGCACAC
AUGAUCAAGUUCAGAGGACACUUCCUGAUCGA
AGGAGACCUGAACCCGGACAACAGCGACGUCG
ACAAGCUGUUCAUCCAGCUGGUCCAGACAUAC
AACCAGCUGUUCGAAGAAAACCCGAUCAACGC
AAGCGGAGUCGACGCAAAGGCAAUCCUGAGCG
CAAGACUGAGCAAGAGCAGAAGACUGGAAAAC
CUGAUCGCACAGCUGCCGGGAGAAAAGAAGAA
CGGACUGUUCGGAAACCUGAUCGCACUGAGCC
UGGGACUGACACCGAACUUCAAGAGCAACUUC
GACCUGGCAGAAGACGCAAAGCUGCAGCUGAG
CAAGGACACAUACGACGACGACCUGGACAACC
UGCUGGCACAGAUCGGAGACCAGUACGCAGAC
CUGUUCCUGGCAGCAAAGAACCUGAGCGACGC
AAUCCUGCUGAGCGACAUCCUGAGAGUCAACA
CAGAAAUCACAAAGGCACCGCUGAGCGCAAGC
AUGAUCAAGAGAUACGACGAACACCACCAGGA
CCUGACACUGCUGAAGGCACUGGUCAGACAGC
AGCUGCCGGAAAAGUACAAGGAAAUCUUCUUC
GACCAGAGCAAGAACGGAUACGCAGGAUACAU
CGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAAUUCUACA
AGUUCAUCAAGCCGAUCCUGGAAAAGAUGGAC
GGAACAGAAGAACUGCUGGUCAAGCUGAACAG
AGAAGACCUGCUGAGAAAGCAGAGAACAUUCG

ACAACGGAAGCAUCCCGCACCAGAUCCACCU
GGAGAACUGCACGCAAUCCUGAGAAGACAGGA
AGACUUCUACCCGUUCCUGAAGGACAACAGAG
AAAAGAUCGAAAAGAUCUGACAUUCAGAAUC
CCGUACUACGUCGGACCGCUGGCAAGAGGAAA
CAGCAGAUUCGCAUGGAUGACAAGAAAGAGCG
AAGAAACAAUCACACCGUGGAACUUCGAAGAA
GUCGUCGACAAGGGAGCAAGCGCACAGAGCUU
CAUCGAAAGAAUGACAAACUUCGACAAGAACC
UGCCGAACGAAAAGGUCCUGCCGAAGCACAGC
CUGCUGUACGAAUACUUCACAGUCUACAACGA
ACUGACAAAGGUCAAGUACGUCACAGAAGGAA
UGAGAAAGCCGGCAUUCCUGAGCGGAGAACAG
AAGAAGGCAAUCGUCGACCUGCUGUUCAAGAC
AAACAGAAAGGUCACAGUCAAGCAGCUGAAGG
AAGACUACUUCAAGAAGAUCGAAUGCUUCGAC
AGCGUCGAAAUCAGCGGAGUCGAAGACAGAUU
CAACGCAAGCCUGGGAACAUACCACGACCUGC
UGAAGAUCAUCAAGGACAAGGACUUCCUGGAC
AACGAAGAAAACGAAGACAUCCUGGAAGACAU
CGUCCUGACACUGACACUGUUCGAAGACAGAG
AAAUGAUCGAAGAAAGACUGAAGACAUACGCA
CACCUGUUCGACGACAAGGUCAUGAAGCAGCU
GAAGAGAAGAAGAUACACAGGAUGGGGAAGA
CUGAGCAGAAAGCUGAUCAACGGAAUCAGAGA
CAAGCAGAGCGGAAAGACAAUCCUGGACUUCC
UGAAGAGCGACGGAUUCGCAAACAGAAACUUC
AUGCAGCUGAUCCACGACGACAGCCUGACAUU
CAAGGAAGACAUCCAGAAGGCACAGGUCAGCG
GACAGGGAGACAGCCUGCACGAACACAUCGCA
AACCUGGCAGGAAGCCCGGCAAUCAAGAAGGG
AAUCCUGCAGACAGUCAAGGUCGUCGACGAAC
UGGUCAAGGUCAUGGGAAGACACAAGCCGGAA
AACAUUCGUCAUCGAAAUGGCAAGAGAAAACCA
GACAACACAGAAGGGACAGAAGAACAGCAGAG

AAAGAAUGAAGAGAAUCGAAGAAGGAAUCA
GGAACUGGGAAGCCAGAUCUGAAGGAACACC
CGGUCGAAAACACACAGCUGCAGAACGAAAAG
CUGUACCUGUACUACCUGCAGAACGGAAGAGA
CAUGUACGUCGACCAGGAACUGGACAUCAACA
GACUGAGCGACUACGACGUCGACCACAUCGUC
CCGCAGAGCUUCCUGAAGGACGACAGCAUCGA
CAACAAGGUCCUGACAAGAAGCGACAAGAACA
GAGGAAAGAGCGACAACGUCCCGAGCGAAGAA
GUCGUCAAGAAGAUGAAGAACUACUGGAGACA
GCUGCUGAACGCAAAGCUGAUCACACAGAGAA
AGUUCGACAACCUGACAAAGGCAGAGAGAGGA
GGACUGAGCGAACUGGACAAGGCAGGAUUCAU
CAAGAGACAGCUGGUCGAAACAAGACAGAUCA
CAAAGCACGUCGCACAGAUCUGGACAGCAGA
AUGAACACAAAGUACGACGAAAACGACAAGCU
GAUCAGAGAAGUCAAGGUCAUCACACUGAAGA
GCAAGCUGGUCAGCGACUUCAGAAAGGACUUC
CAGUUCUACAAGGUCAGAGAAAUCAACAACUA
CCACCACGCACACGACGCAUACCUGAACGCAG
UCGUCGGAACAGCACUGAUCAAGAAGUACCCG
AAGCUGGAAAGCGAAUUCGUCUACGGAGACUA
CAAGGUCUACGACGUCAGAAAGAUGAUCGCAA
AGAGCGAACAGGAAAUCGGAAAGGCAACAGCA
AAGUACUUCUUCUACAGCAACAUCAUGAACU
CUUCAAGACAGAAAUCACACUGGCAAACGGAG
AAAUCAGAAAGAGACCGCUGAUCGAAACAAC
GGAGAAACAGGAGAAAUCGUCUGGGACAAGGG
AAGAGACUUCGCAACAGUCAGAAAGGUCCUGA
GCAUGCCGCAGGUCAACAUCGUCAAGAAGACA
GAAGUCCAGACAGGAGGAUUCAGCAAGGAAAG
CAUCCUGCCGAAGAGAAACAGCGACAAGCUGA
UCGCAAGAAAGAAGGACUGGGACCCGAAGAAG
UACGGAGGAUUCGACAGCCCGACAGUCGCAUA
CAGCGUCCUGGUCGUCGCAAAGGUCGAAAAGG

	<p>GAAAGAGCAAGAAGCUGAAGAGCGUCAAGGAA CUGCUGGGAAUCACAAUCAUGGAAAGAAGCAG CUUCGAAAAGAACCCGAUCGACUCCUGGAAG CAAAGGGAUACAAGGAAGUCAAGAAGGACCUG AUCAUCAAGCUGCCGAAGUACAGCCUGUUCGA ACUGGAAAACGGAAGAAAGAGAAUGCUGGCAA GCGCAGGAGAACUGCAGAAGGGAAACGAACUG GCACUGCCGAGCAAGUACGUCAACUCCUGUA CCUGGCAAGCCACUACGAAAAGCUGAAGGGAA GCCCCGGAAGACAACGAACAGAAGCAGCUGUUC GUCGAACAGCACAAGCACUACCUGGACGAAAU CAUCGAACAGAUCAGCGAAUUCAGCAAGAGAG UCAUCCUGGCAGACGCAAACCUGGACAAGGUC CUGAGCGCAUACAACAAGCACAGAGACAAGCC GAUCAGAGAACAGGCAGAAAACAUCAUCCACC UGUUCACACUGACAAACCUGGGAGCACCGGCA GCAUUCAAGUACUUCGACACAACAUCGACAG AAAGAGAUACACAAGCACAAAGGAAGUCCUGG ACGCAACACUGAUCCACCAGAGCAUCACAGGA CUGUACGAAACAAGAAUCGACCUGAGCCAGCU GGGAGGAGACUAG</p>	
<p>Кодирующая последовательность Cas 9, которая кодирует SEQ ID № 213, используя минимальные кодоны уридина, (но не старт или стоп кодоны, уместные для включения в последовательность, кодирующую гибридный белок)</p>	<p>GACAAGAAGUACAGCAUCGGACUGGACAUCGG AACAAACAGCGUCGGAUGGGCAGUCAUCACAG ACGAAUACAAGGUCCCGAGCAAGAAGUUCAAG GUCCUGGGAAACACAGACAGACACAGCAUCAA GAAGAACCUGAUUCGGAGCACUGCUGUUCGACA GCGGAGAAACAGCAGAAGCAACAAGACUGAAG AGAACAGCAAGAAGAAGAUACACAAGAAGAAA GAACAGAAUCUGCUACCUGCAGGAAAUCUUCA GCAACGAAAUGGCAAAGGUCGACGACAGCUUC UCCACAGACUGGAAGAAAGCUUCCUGGUCGA AGAAGACAAGAAGCACGAAAGACACCCGAUCU UCGGAAACAUCGUCGACGAAGUCGCAUACCAC GAAAAGUACCCGACAAUCUACCACCUGAGAAA GAAGCUGGUCGACAGCACAGACAAGGCAGACC</p>	215

UGAGACUGAUCUACCUGGCACUGGCACACAUG
AUCAAGUUCAGAGGACACUUCCUGAUCGAAGG
AGACCUGAACCCGGACAACAGCGACGUCGACA
AGCUGUUCAUCCAGCUGGUCCAGACAUACAAC
CAGCUGUUCGAAGAAAACCCGAUCAACGCAAG
CGGAGUCGACGCAAAGGCAAUCCUGAGCGCAA
GACUGAGCAAGAGCAGAAGACUGGAAAACCUG
AUCGCACAGCUGCCGGGAGAAAAGAAGAACGG
ACUGUUCGGAAACCUGAUCGCACUGAGCCUGG
GACUGACACCGAACUUCAAGAGCAACUUCGAC
CUGGCAGAAGACGCAAAGCUGCAGCUGAGCAA
GGACACAUACGACGACGACCUGGACAACCUGC
UGGCACAGAUCGGAGACCAGUACGCAGACCUG
UCCUGGCAGCAAAGAACCUGAGCGACGCAAU
CCUGCUGAGCGACAUCCUGAGAGUCAACACAG
AAAUCACAAAGGCACCGCUGAGCGCAAGCAUG
AUCAAGAGAUACGACGAACACCACCAGGACCU
GACACUGCUGAAGGCACUGGUCAGACAGCAGC
UGCCGGAAAAGUACAAGGAAAUCUUCUUCGAC
CAGAGCAAGAACGGAUACGCAGGAUACAUCGA
CGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAAUUCUACAAGU
UCAUCAAGCCGAUCCUGGAAAAGAUGGACGGA
ACAGAAGAACUGCUGGUCAAGCUGAACAGAGA
AGACCUGCUGAGAAAGCAGAGAACAUUCGACA
ACGGAAGCAUCCCGCACCAGAUCACCUGGGA
GAACUGCACGCAAUCCUGAGAAGACAGGAAGA
CUUCUACCCGUUCCUGAAGGACAACAGAGAAA
AGAUCGAAAAGAUCUGACAUCAGAAUCCCG
UACUACGUCGGACCGCUGGCAAGAGGAAACAG
CAGAUUCGCAUGGAUGACAAGAAAGAGCGAAG
AAACAAUCACACCGUGGAACUUCGAAGAAGUC
GUCGACAAGGGAGCAAGCGCACAGAGCUUCAU
CGAAAGAAUGACAAACUUCGACAAGAACCUGC
CGAACGAAAAGGUCCUGCCGAAGCACAGCCUG
CUGUACGAAUACUUCACAGUCUACAACGAACU

GACAAAGGUCAAGUACGUCACAGAAGGAAUGA
GAAAGCCGGCAUUCCUGAGCGGAGAACAGAAG
AAGGCAAUCGUCGACCUGCUGUUCAAGACAAA
CAGAAAGGUCACAGUCAAGCAGCUGAAGGAAG
ACUACUUCAAGAAGAUCGAAUGCUUCGACAGC
GUCGAAAUCAGCGGAGUCGAAGACAGAUUCA
CGCAAGCCUGGGAACAUACCACGACCUGCUGA
AGAUCAUCAAGGACAAGGACUCCUGGACAAC
GAAGAAAACGAAGACAUCCUGGAAGACAUCGU
CCUGACACUGACACUGUUCGAAGACAGAGAAA
UGAUCGAAGAAAGACUGAAGACAUACGCACAC
CUGUUCGACGACAAGGUCAUGAAGCAGCUGAA
GAGAAGAAGAUACACAGGAUGGGGAAGACUG
AGCAGAAAGCUGAUCAACGGAAUCAGAGACAA
GCAGAGCGGAAAGACAAUCCUGGACUCCUGA
AGAGCGACGGAUUCGCAAACAGAAACUUCAUG
CAGCUGAUCCACGACGACAGCCUGACAUCUCAA
GGAAGACAUCCAGAAGGCACAGGUCAGCGGAC
AGGGAGACAGCCUGCACGAACACAUCGCAAAC
CUGGCAGGAAGCCCGGCAAUCAAGAAGGGAAU
CCUGCAGACAGUCAAGGUCGUCGACGAACUGG
UCAAGGUCAUGGGAAGACACAAGCCGGAAAAC
AUCGUCAUCGAAAUGGCAAGAGAAAACCAGAC
AACACAGAAGGGACAGAAGAACAGCAGAGAAA
GAAUGAAGAGAAUCGAAGAAGGAAUCAAGGA
ACUGGGAAGCCAGAUCUGAAGGAACACCCGG
UCGAAAACACACAGCUGCAGAACGAAAAGCUG
UACCUGUACUACCUGCAGAACGGAAGAGACAU
GUACGUCGACCAGGAACUGGACAUCAACAGAC
UGAGCGACUACGACGUCGACCACAUCGUCCG
CAGAGCUUCCUGAAGGACGACAGCAUCGACAA
CAAGGUCCUGACAAGAAGCGACAAGAACAGAG
GAAAGAGCGACAACGUCCCGAGCGAAGAAGUC
GUCAAGAAGAUGAAGAACUACUGGAGACAGCU
GCUGAACGCAAAGCUGAUCACACAGAGAAAGU

UCGACAACCUGACAAAGGCAGAGAGAGGAGGA
CUGAGCGAACUGGACAAGGCAGGAUUCAUCA
GAGACAGCUGGUCGAAACAAGACAGAUCACAA
AGCACGUCGCACAGA UCCUGGACAGCAGAAUG
AACACAAAGUACGACGAAAACGACAAGCUGAU
CAGAGAAGUCAAGGUCAUCACACUGAAGAGCA
AGCUGGUCAGCGACUUCAGAAAGGACUCCAG
UUCUACAAGGUCAGAGAAAUCAACAACUACCA
CCACGCACACGACGCAUACCUGAACGCAGUCG
UCGGAACAGCACUGAUCAAGAAGUACCCGAAG
CUGGAAAGCGAAUUCGUCUACGGAGACUACAA
GGUCUACGACGUCAGAAAGAUGAUCGCAAAGA
GCGAACAGGAAAUCGGAAAGGCAACAGCAAAG
UACUUCUUCUACAGCAACAUCAUGAACUUCU
CAAGACAGAAAUCACACUGGCAAACGGAGAAA
UCAGAAAGAGACCGCUGAUCGAAACAAACGGA
GAAACAGGAGAAAUCGUCUGGGACAAGGGAAG
AGACUUCGCAACAGUCAGAAAGGUCCUGAGCA
UGCCGCAGGUCAACAUCGUCAAGAAGACAGAA
GUCCAGACAGGAGGAUUCAGCAAGGAAAGCAU
CCUGCCGAAGAGAAACAGCGACAAGCUGAUCG
CAAGAAAGAAGGACUGGGACCCGAAGAAGUAC
GGAGGAUUCGACAGCCGACAGUCGCAUACAG
CGUCCUGGUCGUCGCAAAGGUCGAAAAGGGAA
AGAGCAAGAAGCUGAAGAGCGUCAAGGAACUG
CUGGGAAUCACAAUCAUGGAAAGAAGCAGCUU
CGAAAAGAACCCGAUCGACUCCUGGAAGCAA
AGGGAUACAAGGAAGUCAAGAAGGACCUGAUC
AUCAAGCUGCCGAAGUACAGCCUGUUCGAACU
GGAAAACGGAAGAAAGAGAAUGCUGGCAAGCG
CAGGAGAACUGCAGAAGGGAAACGAACUGGCA
CUGCCGAGCAAGUACGUCAACUCCUGUACCU
GGCAAGCCACUACGAAAAGCUGAAGGGAAGCC
CGGAAGACAACGAACAGAAGCAGCUGUUCGUC
GAACAGCACAAGCACUACCUGGACGAAAUCAU

	<p>CGAACAGAUCAGCGAAUUCAGCAAGAGAGUCA UCCUGGCAGACGCAAACCUGGACAAGGUCCUG AGCGCAUACAACAAGCACAGAGACAAGCCGAU CAGAGAACAGGCAGAAAACAUCAUCCACCUGU UCACACUGACAAACCUGGGAGCACCGGCAGCA UUCAAGUACUUCGACACAACAUCGACAGAAA GAGAUACACAAGCACAAAGGAAGUCCUGGACG CAACACUGAUCCACCAGAGCAUCACAGGACUG UACGAAACAAGAAUCGACCUGAGCCAGCUGGG AGGAGAC</p>	
<p>Аминокислотная последовательность Cas 9 нуклеотиды (без NLS)</p>	<p>MDKKYSIGLAIGTNSVGWAVITDEYKVPKFKV LGNTDRHSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTAR RRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFHRLEES FLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLR KKLVDSTDKADLRLIYLALAHMIKFRGHFLIEGDL NPDNSDVDFLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAK AILSARLSKSRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALS LGLTPNFKSNFDLAEDAQLQSKDQYDDDLNLL AQIGDQYADLFLAAKNLSDAILSDILRVNTEITKA PLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPKEYKEI FFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDG TEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELH AILRRQEDFYFPLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLA RGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEEVVDKGASAQS FIERMTNFDKNLPNEKVLPHKSLLYEYFTVYNELT KVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKV TVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTY HDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDRE MIEERLKYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLS RKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDFANRNFMLIHL DDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAI KKGILQTVKVVDELVKVMGRHKPENIVIAMAREN QTTQKGQKNSRERMKRIEELGKELGSQLKEHPVE NTQLQNEKLYLYLQNGRDMYVDQELDINRLSD YDVDHIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDN</p>	<p>216</p>

	<p>VPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTK AERGGELSEDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDS RMNTKYDENDKLIREVKVITLKSKLVSDFRKDFQF YKVREINNYHHAHDAYLNAVVG TALIKKYPKLES EFVYGDYKVYDVRKMIKSEQEIGKATAKYFFYS NIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDK GRDFATVRKVL SMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESIL PKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLV VAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIMERSSEKPNIDF LEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLAS AGELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLGKSPE DNEQKQLFVEQHKHYLDEIEQISEFSKRVLADAN LDKVL SAYNKHRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAP AAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQ SITGLYE TRIDLSQLGGD</p>	
<p>ORF мПНК Cas 9 никазы, кодирующая SEQ ID №: 216, с минимальными кодонами уридина, которые перечислены в Таблице 3, со старт и стоп кодонами</p>	<p>AUGGACAAGAAGUACAGCAUCGGACUGGCAAU CGGAACAAACAGCGUCGGAUGGGCAGUCAUCA CAGACGAAUACAAGGUCCCGAGCAAGAAGUUC AAGGUCCUGGGAAACACAGACAGACACAGCAU CAAGAAGAACCUGAUCGGAGCACUGCUGUUCG ACAGCGGAGAAACAGCAGAAGCAACAAGACUG AAGAGAACAGCAAGAAGAAGAUACACAAGAAG AAAGAACAGAAUCUGCUACCUGCAGGAAAUCU UCAGCAACGAAAUGGCAAAGGUCGACGACAGC UUCUCCACAGACUGGAAGAAAGCUUCCUGGU CGAAGAAGACAAGAAGCACGAAAGACACCCGA UCUUCGGAAACAUCGUCGACGAAGUCGCAUAC CACGAAAAGUACCCGACAAUCUACCACCUGAG AAAGAAGCUGGUCGACAGCACAGACAAGGCAG ACCUGAGACUGAUCUACCUGGCACUGGCACAC AUGAUCAAGUUCAGAGGACACUUCCUGAUCGA AGGAGACCUGAACCCGGACAACAGCGACGUCG ACAAGCUGUUCAUCCAGCUGGUCCAGACAUAC AACCAGCUGUUCGAAGAAAACCCGAUCAACGC AAGCGGAGUCGACGCAAAGGCAAUCCUGAGCG</p>	<p>217</p>

CAAGACUGAGCAAGAGCAGAAGACUGGAAAAC
CUGAUCGCACAGCUGCCGGGAGAAAAGAAGAA
CGGACUGUUCGGAAACCUGAUCGCACUGAGCC
UGGGACUGACACCGAACUUCAAGAGCAACUUC
GACCUGGCAGAAGACGCAAAGCUGCAGCUGAG
CAAGGACACAUACGACGACGACCUGGACAACC
UGCUGGCACAGAUCGGAGACCAGUACGCAGAC
CUGUUCCUGGCAGCAAAGAACCUGAGCGACGC
AAUCCUGCUGAGCGACAUCCUGAGAGUCAACA
CAGAAAUCACAAAGGCACCGCUGAGCGCAAGC
AUGAUCAAGAGAUACGACGAACACCACCAGGA
CCUGACACUGCUGAAGGCACUGGUCAGACAGC
AGCUGCCGGAAAAGUACAAGGAAAUCUUCUUC
GACCAGAGCAAGAACGGAUACGCAGGAUACAU
CGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAAUUCUACA
AGUUCAUCAAGCCGAUCCUGGAAAAGAUGGAC
GGAACAGAAGAACUGCUGGUCAAGCUGAACAG
AGAAGACCUGCUGAGAAAGCAGAGAACAUUCG
ACAACGGAAGCAUCCCGCACCAGAUCCACCUG
GGAGAACUGCACGCAAUCCUGAGAAGACAGGA
AGACUUCUACCCGUUCCUGAAGGACAACAGAG
AAAAGAUCGAAAAGAUCUGACAUUCAGAAUC
CCGUACUACGUCGGACCGCUGGCAAGAGGAAA
CAGCAGAUUCGCAUGGAUGACAAGAAAGAGCG
AAGAAACAAUCACACCGUGGAACUUCGAAGAA
GUCGUCGACAAGGGAGCAAGCGCACAGAGCUU
CAUCGAAAGAAUGACAAACUUCGACAAGAACC
UGCCGAACGAAAAGGUCCUGCCGAAGCACAGC
CUGCUGUACGAAUACUUCACAGUCUACAACGA
ACUGACAAAGGUCAAGUACGUCACAGAAGGAA
UGAGAAAGCCGGCAUUCCUGAGCGGAGAACAG
AAGAAGGCAAUCGUCGACCUGCUGUUCAAGAC
AAACAGAAAGGUCACAGUCAAGCAGCUGAAGG
AAGACUACUUCAAGAAGAUCGAAUGCUUCGAC
AGCGUCGAAAUCAGCGGAGUCGAAGACAGAUU

CAACGCAAGCCUGGGAACAUACCACGACCUGC
UGAAGAUCAUCAAGGACAAGGACUUCCUGGAC
AACGAAGAAAACGAAGACAUCCUGGAAGACAU
CGUCCUGACACUGACACUGUUCGAAGACAGAG
AAAUGAUCGAAGAAAGACUGAAGACAUACGCA
CACCUGUUCGACGACAAGGUCAUGAAGCAGCU
GAAGAGAAGAAGAUACACAGGAUGGGGAAGA
CUGAGCAGAAAGCUGAUCAACGGAAUCAGAGA
CAAGCAGAGCGGAAAGACAAUCCUGGACUUCC
UGAAGAGCGACGGAUUCGCAAACAGAAACUUC
AUGCAGCUGAUCCACGACGACAGCCUGACAUI
CAAGGAAGACAUCCAGAAGGCACAGGUCAGCG
GACAGGGAGACAGCCUGCACGAACACAUCGCA
AACCUGGCAGGAAGCCCGGCAAUCAAGAAGGG
AAUCCUGCAGACAGUCAAGGUCGUCGACGAAC
UGGUCAAGGUCAUGGGAAGACACAAGCCGGAA
ACAUCGUCAUCGAAAUGGCAAGAGAAAACCA
GACAACACAGAAGGGACAGAAGAACAGCAGAG
AAAGAAUGAAGAGAAUCGAAGAAGGAAUCA
GGAACUGGGAAGCCAGAUCUGAAGGAACACC
CGGUCGAAAACACACAGCUGCAGAACGAAAAG
CUGUACCUGUACUACCUGCAGAACGGAAGAGA
CAUGUACGUCGACCAGGAACUGGACAUCAACA
GACUGAGCGACUACGACGUCGACCACAUCGUC
CCGCAGAGCUUCCUGAAGGACGACAGCAUCGA
CAACAAGGUCCUGACAAGAAGCGACAAGAACA
GAGGAAAGAGCGACAACGUCCCGAGCGAAGAA
GUCGUCAAGAAGAUGAAGAACUACUGGAGACA
GCUGCUGAACGCAAAGCUGAUCACACAGAGAA
AGUUCGACAACCUGACAAAGGCAGAGAGAGGA
GGACUGAGCGAACUGGACAAGGCAGGAUUCAU
CAAGAGACAGCUGGUCGAAACAAGACAGAUCA
CAAAGCACGUCGCACAGAUCUGGACAGCAGA
AUGAACACAAAGUACGACGAAAACGACAAGCU
GAUCAGAGAAGUCAAGGUCAUCACACUGAAGA

GCAAGCUGGUCAGCGACUUCAGAAAGGACUUC
CAGUUCUACAAGGUCAGAGAAAUCAACAACUA
CCACCACGCACACGACGCAUACCUGAACGCAG
UCGUCGGAACAGCACUGAUCAAGAAGUACCCG
AAGCUGGAAAGCGAAUUCGUCUACGGAGACUA
CAAGGUCUACGACGUCAGAAAGAUGAUCGCAA
AGAGCGAACAGGAAAUCGGAAAGGCAACAGCA
AAGUACUUCUUCUACAGCAACAUCAUGAACUU
CUUCAAGACAGAAAUCACACUGGCAAACGGAG
AAAUCAGAAAGAGACCGCUGAUCGAAACAAAC
GGAGAAACAGGAGAAAUCGUCUGGGACAAGGG
AAGAGACUUCGCAACAGUCAGAAAGGUCCUGA
GCAUGCCGCAGGUCAACAUCGUCAAGAAGACA
GAAGUCCAGACAGGAGGAUUCAGCAAGGAAAG
CAUCCUGCCGAAGAGAAACAGCGACAAGCUGA
UCGCAAGAAAGAAGGACUGGGACCCGAAGAAG
UACGGAGGAUUCGACAGCCCGACAGUCGCAUA
CAGCGUCCUGGUCGUCGCAAAGGUCGAAAAGG
GAAAGAGCAAGAAGCUGAAGAGCGUCAAGGAA
CUGCUGGGAAUCACAAUCAUGGAAAGAAGCAG
CUUCGAAAAGAACCCGAUCGACUUCUGGAAG
CAAAGGGAUACAAGGAAGUCAAGAAGGACCUG
AUCAUCAAGCUGCCGAAGUACAGCCUGUUCGA
ACUGGAAAACGGAAGAAAGAGAAUGCUGGCAA
GCGCAGGAGAACUGCAGAAGGGAAACGAACUG
GCACUGCCGAGCAAGUACGUCAACUUCUGUA
CCUGGCAAGCCACUACGAAAAGCUGAAGGGAA
GCCCCGAAGACAACGAACAGAAGCAGCUGUUC
GUCGAACAGCACAAAGCACUACCUGGACGAAAU
CAUCGAACAGAUCAGCGAAUUCAGCAAGAGAG
UCAUCCUGGCAGACGCAAACCUGGACAAGGUC
CUGAGCGCAUACAACAAGCACAGAGACAAGCC
GAUCAGAGAACAGGCAGAAAACAUCAUCCACC
UGUUCACACUGACAAACCUGGGAGCACCCGGCA
GCAUUCAAGUACUUCGACACAACAUCGACAG

	AAAGAGAUACACAAGCACAAAGGAAGUCCUGG ACGCAACACUGAUCCACCAGAGCAUCACAGGA CUGUACGAAACAAGAAUCGACCUGAGCCAGCU GGGAGGAGACUAG	
<p>Последовательность, кодирующая Cas 9 никазу, кодирующая SEQ ID №: 216, с минимальными кодонами уридина, которые перечислены в Таблице 3, (не старт и стоп кодонами; уместными для включения в последовательность, кодирующую гибридный белок)</p>	GACAAGAAGUACAGCAUCGGACUGGCAAUCGG AACAAACAGCGUCGGAUGGGCAGUCAUCACAG ACGAAUACAAGGUCCCGAGCAAGAAGUUCAAG GUCCUGGGAAACACAGACAGACACAGCAUCAA GAAGAACCUGAUCCGGAGCACUGCUGUUCGACA GCGGAGAAACAGCAGAAGCAACAAGACUGAAG AGAACAGCAAGAAGAAGAUACACAAGAAGAAA GAACAGAAUCUGCUACCUGCAGGAAAUCUUCA GCAACGAAAUGGCAAAGGUCGACGACAGCUUC UCCACAGACUGGAAGAAAGCUUCCUGGUCGA AGAAGACAAGAAGCACGAAAGACACCCGAUCU UCGGAAACAUCGUCGACGAAGUCGCAUACCAC GAAAAGUACCCGACAAUCUACCACCUGAGAAA GAAGCUGGUCGACAGCACAGACAAGGCAGACC UGAGACUGAUCUACCUGGCACUGGCACACAUG AUCAAGUUCAGAGGACACUCCUGAUCCGAAGG AGACCUGAACCCGGACAACAGCGACGUCGACA AGCUGUUCAUCCAGCUGGUCCAGACAUACAAC CAGCUGUUCGAAGAAAACCCGAUCAACGCAAG CGGAGUCGACGCAAAGGCAAUCCUGAGCGCAA GACUGAGCAAGAGCAGAAGACUGGAAAACCUG AUCGCACAGCUGCCGGGAGAAAAGAAGAACGG ACUGUUCGGAAACCUGAUCCGACUGAGCCUGG GACUGACACCGAACUUCAAGAGCAACUUCGAC CUGGCAGAAGACGCAAAGCUGCAGCUGAGCAA GGACACAUACGACGACGACCUGGACAACCUGC UGGCACAGAUCCGGAGACCAGUACGCAGACCUG UCCUGGCAGCAAAGAACCUGAGCGACGCAAU CCUGCUGAGCGACAUCCUGAGAGUCAACACAG AAAUCACAAAGGCACCGCUGAGCGCAAGCAUG AUCAAGAGAUACGACGAACACCACCAGGACCU	218

GACACUGCUGAAGGCACUGGUCAGACAGCAGC
UGCCGGAAAAGUACAAGGAAAUCUUCUUCGAC
CAGAGCAAGAACGGAUACGCAGGAUACAUCGA
CGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAAUUCUACAAGU
UCAUCAAGCCGAUCCUGGAAAAGAUGGACGGA
ACAGAAGAACUGCUGGUCAAGCUGAACAGAGA
AGACCUGCUGAGAAAGCAGAGAACAUCGACA
ACGGAAGCAUCCCGCACCAGAUCACCUGGGA
GAACUGCACGCAAUCCUGAGAAGACAGGAAGA
CUUCUACCCGUUCCUGAAGGACAACAGAGAAA
AGAUCGAAAAGAUCUGACAUCAGAAUCCCG
UACUACGUCGGACCGCUGGCAAGAGGAAACAG
CAGAUUCGCAUGGAUGACAAGAAAGAGCGAAG
AAACAUCACACCGUGGAACUUCGAAGAAGUC
GUCGACAAGGGAGCAAGCGCACAGAGCUUCAU
CGAAAGAAUGACAAACUUCGACAAGAACCUGC
CGAACGAAAAGGUCCUGCCGAAGCACAGCCUG
CUGUACGAAUACUUCACAGUCUACAACGAACU
GACAAAGGUCAAGUACGUCACAGAAGGAAUGA
GAAAGCCGGCAUUCUGAGCGGAGAACAGAAG
AAGGCAAUCGUCGACCUGCUGUUCAAGACAAA
CAGAAAGGUCACAGUCAAGCAGCUGAAGGAAG
ACUACUUCAAGAAGAUCGAAUGCUUCGACAGC
GUCGAAAUCAGCGGAGUCGAAGACAGAUUCA
CGCAAGCCUGGGAACAUACCACGACCUGCUGA
AGAUCAUCAAGGACAAGGACUCCUGGACAAC
GAAGAAAACGAAGACAUCUGGAAGACAUCGU
CCUGACACUGACACUGUUCGAAGACAGAGAAA
UGAUCGAAGAAAGACUGAAGACAUACGCACAC
CUGUUCGACGACAAGGUCAUGAAGCAGCUGAA
GAGAAGAAGAUACACAGGAUGGGGAAGACUG
AGCAGAAAGCUGAUC AACGGAUCAGAGACAA
GCAGAGCGGAAAGACAAUCCUGGACUCCUGA
AGAGCGACGGAUUCGCAAACAGAAACUUCAUG
CAGCUGAUCCACGACGACAGCCUGACAUCAA

GGAAGACAUCCAGAAGGCACAGGUCAGCGGAC
AGGGAGACAGCCUGCACGAACACAUCGCAAAC
CUGGCAGGAAGCCCGGCAAUCAAGAAGGGAAU
CCUGCAGACAGUCAAGGUCGUCGACGAACUGG
UCAAGGUCAUGGGAAGACACAAGCCGGAAAAC
AUCGUCAUCGAAAUGGCAAGAGAAAACCAGAC
AACACAGAAGGGACAGAAGAACAGCAGAGAAA
GAAUGAAGAGAAUCGAAGAAGGAAUCAAGGA
ACUGGGAAGCCAGAUCCUGAAGGAACACCCGG
UCGAAAACACACAGCUGCAGAACGAAAAGCUG
UACCUGUACUACCUGCAGAACGGAAGAGACAU
GUACGUCGACCAGGAACUGGACAUCAACAGAC
UGAGCGACUACGACGUCGACCACAUCGUCCG
CAGAGCUUCCUGAAGGACGACAGCAUCGACAA
CAAGGUCCUGACAAGAAGCGACAAGAACAGAG
GAAAGAGCGACAACGUCCCGAGCGAAGAAGUC
GUCAAGAAGAUGAAGAACUACUGGAGACAGCU
GCUGAACGCAAAGCUGAUCACACAGAGAAAGU
UCGACAACCUGACAAAGGCAGAGAGAGGAGGA
CUGAGCGAACUGGACAAGGCAGGAUUCAUCAA
GAGACAGCUGGUCGAAACAAGACAGAUCACAA
AGCACGUCGCACAGA UCCUGGACAGCAGAAUG
AACACAAAGUACGACGAAAACGACAAGCUGAU
CAGAGAAGUCAAGGUCAUCACACUGAAGAGCA
AGCUGGUCAGCGACUUCAGAAAGGACUUC CAG
UUCUACAAGGUCAGAGAAAUCAACAACUACCA
CCACGCACACGACGCAUACCUGAACGCAGUCG
UCGGAACAGCACUGAUCAAGAAGUACCCGAAG
CUGGAAAGCGAAUUCGUCUACGGAGACUACAA
GGUCUACGACGUCAGAAAGAUGAUCGCAAAGA
GCGAACAGGAAAUCGGAAAGGCAACAGCAAAG
UACUUCUUCUACAGCAACAUCAUGAACUUCU
CAAGACAGAAAUCACACUGGCAAACGGAGAAA
UCAGAAAGAGACCGCUGAUCGAAACAAACGGA
GAAACAGGAGAAAUCGUCUGGGACAAGGGAAG

	AGACUUCGCAACAGUCAGAAAGGUCCUGAGCA UGCCGCAGGUCAACAUCGUCAAGAAGACAGAA GUCCAGACAGGAGGAUUCAGCAAGGAAAGCAU CCUGCCGAAGAGAAACAGCGACAAGCUGAUCG CAAGAAAGAAGGACUGGGACCCGAAGAAGUAC GGAGGAUUCGACAGCCCGACAGUCGCAUACAG CGUCCUGGUCGUCGCAAAGGUCGAAAAGGGAA AGAGCAAGAAGCUGAAGAGCGUCAAGGAACUG CUGGGAAUCACAAUCAUGGAAAGAAGCAGCUU CGAAAAGAACCCGAUCGACUUCUGGAAGCAA AGGGAUACAAGGAAGUCAAGAAGGACCUGAUC AUCAAGCUGCCGAAGUACAGCCUGUUCGAACU GGAAAACGGAAGAAAGAGAAUGCUGGCAAGCG CAGGAGAACUGCAGAAGGGAAACGAACUGGCA CUGCCGAGCAAGUACGUCAACUUCUGUACCU GGCAAGCCACUACGAAAAGCUGAAGGGAAGCC CGGAAGACAACGAACAGAAGCAGCUGUUCGUC GAACAGCACAAAGCACUACCUGGACGAAAUCAU CGAACAGAUCAGCGAAUUCAGCAAGAGAGUCA UCCUGGCAGACGCAAACCUGGACAAGGUCCUG AGCGCAUACAACAAGCACAGAGACAAGCCGAU CAGAGAACAGGCAGAAAACAUCAUCCACCUGU UCACACUGACAAACCUGGGAGCACCGGCAGCA UUCAAGUACUUCGACACAACAUCGACAGAAA GAGAUACACAAGCACAAAGGAAGUCCUGGACG CAACACUGAUCCACCAGAGCAUCACAGGACUG UACGAAACAAGAAUCGACCUGAGCCAGCUGGG AGGAGAC	
Аминокислотная последовательность dCas 9 (без NLS)	MDKKYSIGLAIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKV LGNTDRHSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTAR RRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFHRLLEES FLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLR KKLVDSTDKADLRLIYLALAHMIKFRGHFLIEGDL NPDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAK AILSARLSKSRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALS	219

	<p>LGLTPNFKSNFDLAEDAQLQLSKDTYDDDLNLL AQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKA PLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEI FFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDG TEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELH AILRRQEDFYPFLLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLA RGNSRF AWMTRKSEETITPWNFEEVVDKGASAQS FIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYFTVYNELT KVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKV TVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTY HDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDRE MIEERLKYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLS RKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDFANRNFMLIH DDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAI KKGILQTVKVVDELVKVMGRHKPENIVIEMAREN QTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQILKEHPVE NTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSD YDVDAIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDN VPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTK AERGGELSEDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDS RMNTKYDENDKLIREVKVITLKSKLVSDFRKDFQF YKVREINNYHHAHDAYLNAVVGTAIIKKYPKLES EFVYGDYKVYDVRKMIAKSEQEIGKATAKYFFYS NIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDK GRDFATVRKVL SMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESIL PKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLV VAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIMERSSEKPNIDF LEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLAS AGELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGSPE DNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVLADAN LDKVL SAYNKHRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAP AAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQ SITGLYE TRIDLSQLGGD</p>	
<p>ORF мPHK dCas, которая кодирует SEQ</p>	<p>AUGGACAAGAAGUACAGCAUCGGACUGGCAAU CGGAACAAACAGCGUCGGAUGGGCAGUCAUCA</p>	<p>220</p>

<p>ID №: 219, используя минимальные кодоны уридина, перечисленные в Таблице 3, со стартом стоп кодонами</p>	<p>CAGACGAAUACAAGGUCCCGAGCAAGAAGUUC AAGGUCCUGGGAAACACAGACAGACACAGCAU CAAGAAGAACCUGAUCGGAGCACUGCUGUUCG ACAGCGGAGAAACAGCAGAAGCAACAAGACUG AAGAGAACAGCAAGAAGAAGAUACACAAGAAG AAAGAACAGAAUCUGCUACCUGCAGGAAAUCU UCAGCAACGAAAUGGCAAAGGUCGACGACAGC UUCUUCCACAGACUGGAAGAAAGCUUCCUGGU CGAAGAAGACAAGAAGCACGAAAGACACCCGA UCUUCGGAAACAUCGUCGACGAAGUCGCAUAC CACGAAAAGUACCCGACAAUCUACCACCUGAG AAAGAAGCUGGUCGACAGCACAGACAAGGCAG ACCUGAGACUGAUCUACCUGGCACUGGCACAC AUGAUCAAGUUCAGAGGACACUUCCUGAUCGA AGGAGACCUGAACCCGGACAACAGCGACGUCG ACAAGCUGUUCAUCCAGCUGGUCCAGACAUAC AACCAGCUGUUCGAAGAAAACCCGAUCAACGC AAGCGGAGUCGACGCAAAGGCAAUCCUGAGCG CAAGACUGAGCAAGAGCAGAAGACUGGAAAAC CUGAUCGCACAGCUGCCGGGAGAAAAGAAGAA CGGACUGUUCGGAAACCUGAUCGCACUGAGCC UGGGACUGACACCGAACUUCAAGAGCAACUUC GACCUGGCAGAAGACGCAAAGCUGCAGCUGAG CAAGGACACAUACGACGACGACCUGGACAACC UGCUGGCACAGAUCGGAGACCAGUACGCAGAC CUGUUCCUGGCAGCAAAGAACCUGAGCGACGC AAUCCUGCUGAGCGACAUCUGAGAGUCAACA CAGAAAUCACAAAGGCACCGCUGAGCGCAAGC AUGAUCAAGAGAUACGACGAACACCACCAGGA CCUGACACUGCUGAAGGCACUGGUCAGACAGC AGCUGCCGGAAAAGUACAAGGAAAUCUUCUUC GACCAGAGCAAGAACGGAUACGCAGGAUACAU CGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAAUUCUACA AGUUCAUCAAGCCGAUCCUGGAAAAGAUGGAC GGAACAGAAGAACUGCUGGUCAAGCUGAACAG</p>
---	--

AGAAGACCUGCUGAGAAAGCAGAGAACAUUCG
ACAACGGAAGCAUCCCGCACCAGAUCACCUG
GGAGAACUGCACGCAAUCCUGAGAAGACAGGA
AGACUUCUACCCGUUCCUGAAGGACAACAGAG
AAAAGAUCGAAAAGAUCUGACAUUCAGAAUC
CCGUACUACGUCGGACCGCUGGCAAGAGGAAA
CAGCAGAUUCGCAUGGAUGACAAGAAAGAGCG
AAGAAACAAUCACACCGUGGAACUUCGAAGAA
GUCGUCGACAAGGGAGCAAGCGCACAGAGCUU
CAUCGAAAGAAUGACAAACUUCGACAAGAACC
UGCCGAACGAAAAGGUCCUGCCGAAGCACAGC
CUGCUGUACGAAUACUUCACAGUCUACAACGA
ACUGACAAAGGUCAAGUACGUCACAGAAGGAA
UGAGAAAGCCGGCAUUCCUGAGCGGAGAACAG
AAGAAGGCAAUCGUCGACCUGCUGUUCAAGAC
AAACAGAAAGGUCACAGUCAAGCAGCUGAAGG
AAGACUACUUCAAGAAGAUCGAAUGCUUCGAC
AGCGUCGAAAUCAGCGGAGUCGAAGACAGAUU
CAACGCAAGCCUGGGAACAUAACCACGACCUGC
UGAAGAUCAUCAAGGACAAGGACUUCCUGGAC
AACGAAGAAAACGAAGACAUCCUGGAAGACAU
CGUCCUGACACUGACACUGUUCGAAGACAGAG
AAAUGAUCGAAGAAAGACUGAAGACAUACGCA
CACCUGUUCGACGACAAGGUCAUGAAGCAGCU
GAAGAGAAGAAGAUACACAGGAUGGGGAAGA
CUGAGCAGAAAGCUGAUCAACGGAAUCAGAGA
CAAGCAGAGCGGAAAGACAAUCCUGGACUUC
UGAAGAGCGACGGAUUCGCAAACAGAAACUUC
AUGCAGCUGAUCCACGACGACAGCCUGACAUI
CAAGGAAGACAUCCAGAAGGCACAGGUCAGCG
GACAGGGAGACAGCCUGCACGAACACAUCGCA
AACCUGGCAGGAAGCCCGGCAAUCAAGAAGGG
AAUCCUGCAGACAGUCAAGGUCGUCGACGAAC
UGGUCAAGGUCAUGGGAAGACACAAGCCGGAA
AACAUUCGUCAUCGAAAUGGCAAGAGAAAACCA

GACAACACAGAAGGGACAGAAGAACAGCAGAG
AAAGAAUGAAGAGAAUCGAAGAAGGAAUCAA
GGAACUGGGAAGCCAGA UCCUGAAGGAACACC
CGGUCGAAAACACACAGCUGCAGAACGAAAAG
CUGUACCUGUACUACCUGCAGAACGGAAGAGA
CAUGUACGUCGACCAGGAACUGGACAUCAACA
GACUGAGCGACUACGACGUCGACGCAAUCGUC
CCGCAGAGCUUCCUGAAGGACGACAGCAUCGA
CAACAAGGUCCUGACAAGAAGCGACAAGAACA
GAGGAAAGAGCGACAACGUCCCGAGCGAAGAA
GUCGUCAAGAAGAUGAAGAACUACUGGAGACA
GCUGCUGAACGCAAAGCUGAUCACACAGAGAA
AGUUCGACAACCUGACAAAGGCAGAGAGAGGA
GGACUGAGCGAACUGGACAAGGCAGGAUUCAU
CAAGAGACAGCUGGUCGAAACAAGACAGAUCA
CAAAGCACGUCGCACAGA UCCUGGACAGCAGA
AUGAACACAAAGUACGACGAAAACGACAAGCU
GAUCAGAGAAGUCAAGGUCAUCACACUGAAGA
GCAAGCUGGUCAGCGACUUCAGAAAGGACUUC
CAGUUCUACAAGGUCAGAGAAAUCAACAACUA
CCACCACGCACACGACGCAUACCUGAACGCAG
UCGUCGGAACAGCACUGAUCAAGAAGUACCCG
AAGCUGGAAAGCGAAUUCGUCUACGGAGACUA
CAAGGUCUACGACGUCAGAAAGAUGAUCGCAA
AGAGCGAACAGGAAAUCGGAAAGGCAACAGCA
AAGUACUUCUUCUACAGCAACAUCAUGAACU
CUUCAAGACAGAAAUCACACUGGCAAACGGAG
AAAUCAGAAAGAGACCGCUGAUCGAAACAAAC
GGAGAAACAGGAGAAAUCGUCUGGGACAAGGG
AAGAGACUUCGCAACAGUCAGAAAGGUCCUGA
GCAUGCCGCAGGUCAACAUCGUCAAGAAGACA
GAAGUCCAGACAGGAGGAUUCAGCAAGGAAAG
CAUCCUGCCGAAGAGAAACAGCGACAAGCUGA
UCGCAAGAAAGAAGGACUGGGACCCGAAGAAG
UACGGAGGAUUCGACAGCCCGACAGUCGCAUA

	<p>CAGCGUCCUGGUCGUCGCAAAGGUCGAAAAGG GAAAGAGCAAGAAGCUGAAGAGCGUCAAGGAA CUGCUGGGAAUCACAAUCAUGGAAAGAAGCAG CUUCGAAAAGAACCCGAUCGACUUCUGGAAG CAAAGGGAUACAAGGAAGUCAAGAAGGACCUG AUCAUCAAGCUGCCGAAGUACAGCCUGUUCGA ACUGGAAAACGGAAGAAAGAGAAUGCUGGCAA GCGCAGGAGAACUGCAGAAGGGAAACGAACUG GCACUGCCGAGCAAGUACGUCAACUUCUGUA CCUGGCAAGCCACUACGAAAAGCUGAAGGGAA GCCC GGAAGACAACGAACAGAAGCAGCUGUUC GUCGAACAGCACAAGCACUACCUGGACGAAU CAUCGAACAGAUCAGCGAAUUCAGCAAGAGAG UCAUCCUGGCAGACGCAAACCUGGACAAGGUC CUGAGCGCAUACAACAAGCACAGAGACAAGCC GAUCAGAGAACAGGCAGAAAACAUCAUCCACC UGUUCACACUGACAAACCUGGGAGCACCGGCA GCAUUCAAGUACUUCGACACAACAUCGACAG AAAGAGAUACACAAGCACAAAGGAAGUCCUGG ACGCAACACUGAUCCACCAGAGCAUCACAGGA CUGUACGAAACAAGAAUCGACCUGAGCCAGCU GGGAGGAGACUAG</p>	
<p>Кодирующая последовательность dCas 9, которая кодирует SEQ ID № 219, используя минимальные кодоны уридина, перечисленные в Таблице 3 (но не старт или стоп кодоны, уместные для включения в последовательность,</p>	<p>GACAAGAAGUACAGCAUCGGACUGGCAAUCGG AACAAACAGCGUCGGAUGGGCAGUCAUCACAG ACGAAUACAAGGUCCCGAGCAAGAAGUUCAAG GUCCUGGGAAACACAGACAGACACAGCAUCAA GAAGAACCUGAUCGGAGCACUGCUGUUCGACA GCGGAGAAACAGCAGAAGCAACAAGACUGAAG AGAACAGCAAGAAGAAGAUACACAAGAAGAAA GAACAGAAUCUGCUACCUGCAGGAAAUCUUCA GCAACGAAAUGGCAAAGGUCGACGACAGCUUC UUCCACAGACUGGAAGAAAGCUUCCUGGUCGA AGAAGACAAGAAGCACGAAAGACACCCGAUCU UCGGAAACAUCGUCGACGAAGUCGCAUACCAC GAAAAGUACCCGACAAUCUACCACCUGAGAAA</p>	<p>221</p>

кодирующую
гибридный белок)

GAAGCUGGUCGACAGCACAGACAAGGCAGACC
UGAGACUGAUCUACCUGGCACUGGCACACAUG
AUCAAGUUCAGAGGACACUUCCUGAUCGAAGG
AGACCUGAACCCGGACAACAGCGACGUCGACA
AGCUGUUCAUCCAGCUGGUCCAGACAUACAAC
CAGCUGUUCGAAGAAAACCCGAUCAACGCAAG
CGGAGUCGACGCAAAGGCAAUCCUGAGCGCAA
GACUGAGCAAGAGCAGAAGACUGGAAAACCUG
AUCGCACAGCUGCCGGGAGAAAAGAAGAACGG
ACUGUUCGGAAACCUGAUCGCACUGAGCCUGG
GACUGACACCGAACUUCAAGAGCAACUUCGAC
CUGGCAGAAGACGCAAAGCUGCAGCUGAGCAA
GGACACAUACGACGACGACCUGGACAACCUGC
UGGCACAGAUCCGGAGACCAGUACGCAGACCUG
UCCUGGCAGCAAAGAACCUGAGCGACGCAAU
CCUGCUGAGCGACAUCCUGAGAGUCAACACAG
AAAUCACAAAGGCACCGCUGAGCGCAAGCAUG
AUCAAGAGAUACGACGAACACCACCAGGACCU
GACACUGCUGAAGGCACUGGUCAGACAGCAGC
UGCCGGAAAAGUACAAGGAAAUCUUCUUCGAC
CAGAGCAAGAACGGAUACGCAGGAUACAUCGA
CGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAAUUCUACAAGU
UCAUCAAGCCGAUCCUGGAAAAGAUGGACGGA
ACAGAAGAACUGCUGGUCAAGCUGAACAGAGA
AGACCUGCUGAGAAAGCAGAGAACAUCGACA
ACGGAAGCAUCCCGCACCAGAUCACCUGGGA
GAACUGCACGCAAUCCUGAGAAGACAGGAAGA
CUUCUACCCGUUCCUGAAGGACAACAGAGAAA
AGAUCGAAAAGAUCUGACAUCAGAAUCCCG
UACUACGUCGGACCGCUGGCAAGAGGAAACAG
CAGAUUCGCAUGGAUGACAAGAAAGAGCGAAG
AAACAUCACACCGUGGAACUUCGAAGAAGUC
GUCGACAAGGGAGCAAGCGCACAGAGCUUCAU
CGAAAGAAUGACAAACUUCGACAAGAACCUGC
CGAACGAAAAGGUCCUGCCGAAGCACAGCCUG

CUGUACGAAUACUUCACAGUCUACAACGAACU
GACAAAGGUCAAGUACGUCACAGAAGGAAUGA
GAAAGCCGGCAUUCCUGAGCGGAGAACAGAAG
AAGGCAAUCGUCGACCUGCUGUUCAAGACAAA
CAGAAAGGUCACAGUCAAGCAGCUGAAGGAAG
ACUACUUCAAGAAGAUCGAAUGCUUCGACAGC
GUCGAAAUCAGCGGAGUCGAAGACAGAUUCA
CGCAAGCCUGGGAACAUAACCACGACCUGCUGA
AGAUCAUCAAGGACAAGGACUUCCUGGACAAC
GAAGAAAACGAAGACAUCCUGGAAGACAUCGU
CCUGACACUGACACUGUUCGAAGACAGAGAAA
UGAUCGAAGAAAGACUGAAGACAUACGCACAC
CUGUUCGACGACAAGGUCAUGAAGCAGCUGAA
GAGAAGAAGAUACACAGGAUGGGGAAGACUG
AGCAGAAAGCUGAUAACGGAAUCAGAGACAA
GCAGAGCGGAAAGACAAUCCUGGACUUCCUGA
AGAGCGACGGAUUCGCAAACAGAAACUUCAUG
CAGCUGAUCCACGACGACAGCCUGACAUUCA
GGAAGACAUCCAGAAGGCACAGGUCAGCGGAC
AGGGAGACAGCCUGCACGAACACAUCGCAAAC
CUGGCAGGAAGCCCGGCAAUCAAGAAGGGAAU
CCUGCAGACAGUCAAGGUCGUCGACGAACUGG
UCAAGGUCAUGGGAAGACACAAGCCGGAAAAC
AUCGUCAUCGAAAUGGCAAGAGAAAACCAGAC
AACACAGAAGGGACAGAAGAACAGCAGAGAAA
GAAUGAAGAGAAUCGAAGAAGGAAUCAAGGA
ACUGGGAAGCCAGA UCCUGAAGGAACACCCGG
UCGAAAACACACAGCUGCAGAACGAAAAGCUG
UACCUGUACUACCUGCAGAACGGAAGAGACAU
GUACGUCGACCAGGAACUGGACAUCAACAGAC
UGAGCGACUACGACGUCGACGCAAUCGUCCG
CAGAGCUUCCUGAAGGACGACAGCAUCGACAA
CAAGGUCCUGACAAGAAGCGACAAGAACAGAG
GAAAGAGCGACAACGUCCCGAGCGAAGAAGUC
GUCAAGAAGAUGAAGAACUACUGGAGACAGCU

GCUGAACGCAAAGCUGAUCACACAGAGAAAGU
UCGACAACCUGACAAAGGCAGAGAGAGGAGGA
CUGAGCGAACUGGACAAGGCAGGAUUCAUCA
GAGACAGCUGGUCGAAACAAGACAGAUCACAA
AGCACGUCGCACAGA UCCUGGACAGCAGAAUG
AACACAAAGUACGACGAAAACGACAAGCUGAU
CAGAGAAGUCAAGGUCAUCACACUGAAGAGCA
AGCUGGUCAGCGACUUCAGAAAGGACUCCAG
UUCUACAAGGUCAGAGAAAUCAACAACUACCA
CCACGCACACGACGCAUACCUGAACGCAGUCG
UCGGAACAGCACUGAUCAAGAAGUACCCGAAG
CUGGAAAGCGAAUUCGUCUACGGAGACUACAA
GGUCUACGACGUCAGAAAGAUGAUCGCAAAGA
GCGAACAGGAAAUCGGAAAGGCAACAGCAAAG
UACUUCUUCUACAGCAACAUCAUGAACUUCU
CAAGACAGAAAUCACACUGGCAAACGGAGAAA
UCAGAAAGAGACCGCUGAUCGAAACAAACGGA
GAAACAGGAGAAAUCGUCUGGGACAAGGGAAG
AGACUUCGCAACAGUCAGAAAGGUCCUGAGCA
UGCCGCAGGUCAACAUCGUCAAGAAGACAGAA
GUCCAGACAGGAGGAUUCAGCAAGGAAAGCAU
CCUGCCGAAGAGAAACAGCGACAAGCUGAUCG
CAAGAAAGAAGGACUGGGACCCGAAGAAGUAC
GGAGGAUUCGACAGCCGACAGUCGCAUACAG
CGUCCUGGUCGUCGCAAAGGUCGAAAAGGGAA
AGAGCAAGAAGCUGAAGAGCGUCAAGGAACUG
CUGGGAAUCACAAUCAUGGAAAGAAGCAGCUU
CGAAAAGAACCCGAUCGACUCCUGGAAGCAA
AGGGAUACAAGGAAGUCAAGAAGGACCUGAUC
AUCAAGCUGCCGAAGUACAGCCUGUUCGAACU
GGAAAACGGAAGAAAGAGAAUGCUGGCAAGCG
CAGGAGAACUGCAGAAGGGAAACGAACUGGCA
CUGCCGAGCAAGUACGUCAACUCCUGUACCU
GGCAAGCCACUACGAAAAGCUGAAGGGAAGCC
CGGAAGACAACGAACAGAAGCAGCUGUUCGUC

	<p>GAACAGCACAAGCACUACCUUGGACGAAAUCAU CGAACAGAUCAGCGAAUUCAGCAAGAGAGUCA UCCUGGCAGACGCAAACCUGGACAAGGUCCUG AGCGCAUACAACAAGCACAGAGACAAGCCGAU CAGAGAACAGGCAGAAAACAUCAUCCACCUGU UCACACUGACAAACCUGGGAGCACCGGCAGCA UUCAAGUACUUCGACACAACAAUCGACAGAAA GAGAUACACAAGCACAAAGGAAGUCCUGGACG CAACACUGAUCCACCAGAGCAUCACAGGACUG UACGAAACAAGAAUCGACCUGAGCCAGCUGGG AGGAGACGGAGGAGGAAGC</p>	
<p>Аминокислотная последовательность Cas 9 с двумя сигналами ядерной локализации (2xNLS), в качестве С- терминальных аминокислот</p>	<p>MDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSSKFKV LGNTDRHSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTAR RRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSSFFHRLEES FLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLR KKLVDSTDKADLRLIYLALAHMIKFRGHFLIEGDL NPDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAK AILSARLSKSRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALS LGLTPNFKSNFDLAEDAQLSKDTYDDDLNLL AQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKA PLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEI FFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDG TEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELH AILRRQEDFYPFLLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLA RGNSRF AWMTRKSEETITPWNFEEVVDK GASAQS FIERMTNFDKNLPNEKVLPHSLLYEYFTVYNELT KVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKV TVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTY HDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDRE MIEERLKYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLS RKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDFANRNFMLIH DDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAI KKGILQTVKVVDELVKVMGRHKPENIVIAMAREN QTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQILKEHPVE NTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSD</p>	<p>222</p>

	<p>YDVDHIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDN VPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTK AERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDS RMNTKYDENDKLIREVKVITLKSKLVSDFRKDFQF YK VREINNYHHAHDAYLNAVVG TALIKKYPKLES EFVYGDYKVYDVRKMIKSEQEIGKATAKYFFYS NIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDK GRDFATVRKVL SMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESIL PKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLV VAKVEK GKSKKLKSVKELLGITIMERS SFEKNPIDF LEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLAS AGELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGSPE DNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVILADAN LDKVL SAYNKH RDKPIREQAENIIHLFTL TNLGAP AAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVL DATLIHQ SITGLYE TRIDL SQLGGD GSGSPKKKRKVDGSPKKKRKVDS G</p>	
<p>ORF мPHK Cas 9, кодирующая SEQ ID №: 222, используя минимальные кодоны уридина со старт и стоп кодонами</p>	<p>AUGGACAAGAAGUACAGCAUCGGACUGGACAU CGGAACAACAGCGUCGGAUGGGCAGUCAUCA CAGACGAAUACAAGGUCCCGAGCAAGAAGUUC AAGGUCCUGGAAACACAGACAGACACAGCAU CAAGAAGAACCUGAUCGGAGCACUGCUGUUCG ACAGCGGAGAAACAGCAGAAGCAACAAGACUG AAGAGAACAGCAAGAAGAAGAUACACAAGAAG AAAGAACAGAAUCUGCUACCUGCAGGAAAUCU UCAGCAACGAAAUGGCAAAGGUCGACGACAGC UUCUCCACAGACUGGAAGAAAGCUUCCUGGU CGAAGAAGACAAGAAGCACGAAAGACACCCGA UCUUCGGAACAUCGUCGACGAAGUCGCAUAC CACGAAAAGUACCCGACAAUCUACCACCUGAG AAAGAAGCUGGUCGACAGCACAGACAAGGCAG ACCUGAGACUGAUCUACCUGGCACUGGCACAC AUGAUCAAGUUCAGAGGACACUUCUGAUCGA AGGAGACCUGAACCCGGACAACAGCGACGUCG ACAAGCUGUUCAUCCAGCUGGUCCAGACAUAC</p>	<p>223</p>

AACCAGCUGUUCGAAGAAAACCCGAUCAACGC
AAGCGGAGUCGACGCAAAGGCAAUCCUGAGCG
CAAGACUGAGCAAGAGCAGAAGACUGGAAAAC
CUGAUCGCACAGCUGCCGGGAGAAAAGAAGAA
CGGACUGUUCGGAAACCUGAUCGCACUGAGCC
UGGGACUGACACCGAACUUCAAGAGCAACUUC
GACCUGGCAGAAGACGCAAAGCUGCAGCUGAG
CAAGGACACAUACGACGACGACCUGGACAACC
UGCUGGCACAGAUCGGAGACCAGUACGCAGAC
CUGUUCCUGGCAGCAAAGAACCUGAGCGACGC
AAUCCUGCUGAGCGACAUCCUGAGAGUCAACA
CAGAAAUCACAAAGGCACCGCUGAGCGCAAGC
AUGAUCAAGAGAUACGACGAACACCACCAGGA
CCUGACACUGCUGAAGGCACUGGUCAGACAGC
AGCUGCCGGAAAAGUACAAGGAAAUCUUCUUC
GACCAGAGCAAGAACGGAUACGCAGGAUACAU
CGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAAUUCUACA
AGUUCAUCAAGCCGAUCCUGGAAAAGAUGGAC
GGAACAGAAGAACUGCUGGUCAAGCUGAACAG
AGAAGACCUGCUGAGAAAGCAGAGAACAUUCG
ACAACGGAAGCAUCCCGCACCCAGAUCCACCUG
GGAGAACUGCACGCAAUCCUGAGAAGACAGGA
AGACUUCUACCCGUUCCUGAAGGACAACAGAG
AAAAGAUUCGAAAAGAUCCUGACAUUCAGAAUC
CCGUACUACGUCGGACCGCUGGCAAGAGGAAA
CAGCAGAUUCGCAUGGAUGACAAGAAAGAGCG
AAGAAACAAUCACACCGUGGAACUUCGAAGAA
GUCGUCGACAAGGGAGCAAGCGCACAGAGCUU
CAUCGAAAGAAUGACAAACUUCGACAAGAACC
UGCCGAACGAAAAGGUCCUGCCGAAGCACAGC
CUGCUGUACGAAUACUUCACAGUCUACAACGA
ACUGACAAAGGUCAAGUACGUCACAGAAGGAA
UGAGAAAGCCGGCAUUCUGAGCGGAGAACAG
AAGAAGGCAAUCGUCGACCUGCUGUUCAAGAC
AAACAGAAAGGUCACAGUCAAGCAGCUGAAGG

AAGACUACUUCAAGAAGAUCGAAUGCUUCGAC
AGCGUCGAAAUCAGCGGAGUCGAAGACAGAUU
CAACGCAAGCCUGGGAACAUACCACGACCUGC
UGAAGAUCAUCAAGGACAAGGACUUCCUGGAC
AACGAAGAAAACGAAGACAUCCUGGAAGACAU
CGUCCUGACACUGACACUGUUCGAAGACAGAG
AAAUGAUCGAAGAAAGACUGAAGACAUACGCA
CACCUGUUCGACGACAAGGUCAUGAAGCAGCU
GAAGAGAAGAAGAUACACAGGAUAGGGGAAGA
CUGAGCAGAAAGCUGAUAACGGAAUCAGAGA
CAAGCAGAGCGGAAAGACAAUCCUGGACUUCC
UGAAGAGCGACGGAUUCGCAAACAGAAACUUC
AUGCAGCUGAUCCACGACGACAGCCUGACAUI
CAAGGAAGACAUCCAGAAGGCACAGGUCAGCG
GACAGGGAGACAGCCUGCACGAACACAUCGCA
AACCUGGCAGGAAGCCCGGCAAUCAAGAAGGG
AAUCCUGCAGACAGUCAAGGUCGUCGACGAAC
UGGUCAAGGUCAUGGGAAGACACAAGCCGGAA
ACAUCGUCAUCGAAAUGGCAAGAGAAAACCA
GACAACACAGAAGGGACAGAAGAACAGCAGAG
AAAGAAUGAAGAGAAUCGAAGAAGGAAUCA
GGAACUGGGAAGCCAGAUCUGAAGGAACACC
CGGUCGAAAACACACAGCUGCAGAACGAAAAG
CUGUACCUGUACUACCUGCAGAACGGAAGAGA
CAUGUACGUCGACCAGGAACUGGACAUCAACA
GACUGAGCGACUACGACGUCGACCACAUCGUC
CCGCAGAGCUUCCUGAAGGACGACAGCAUCGA
CAACAAGGUCCUGACAAGAAGCGACAAGAACA
GAGGAAAGAGCGACAACGUCCCGAGCGAAGAA
GUCGUCAAGAAGAUGAAGAACUACUGGAGACA
GCUGCUGAACGCAAAGCUGAUCACACAGAGAA
AGUUCGACAACCUGACAAGGCAGAGAGAGGA
GGACUGAGCGAACUGGACAAGGCAGGAUUCAU
CAAGAGACAGCUGGUCGAAACAAGACAGAUCA
CAAAGCACGUCGCACAGAUCUGGACAGCAGA

AUGAACACAAAGUACGACGAAAACGACAAGCU
GAUCAGAGAAGUCAAGGUCAUCACACUGAAGA
GCAAGCUGGUCAGCGACUUCAGAAAGGACUUC
CAGUUCUACAAGGUCAGAGAAAUCAACAACUA
CCACCACGCACACGACGCAUACCUGAACGCAG
UCGUCGGAACAGCACUGAUCAAGAAGUACCCG
AAGCUGGAAAGCGAAUUCGUCUACGGAGACUA
CAAGGUCUACGACGUCAGAAAGAUGAUCGCAA
AGAGCGAACAGGAAAUCGGAAAGGCAACAGCA
AAGUACUUCUUCUACAGCAACAUCAUGAACUU
CUUCAAGACAGAAAUCACACUGGCAAACGGAG
AAAUCAGAAAGAGACCGCUGAUCGAAACAAAC
GGAGAAACAGGAGAAAUCGUCUGGGACAAGGG
AAGAGACUUCGCAACAGUCAGAAAGGUCCUGA
GCAUGCCGCAGGUCAACAUCGUCAAGAAGACA
GAAGUCCAGACAGGAGGAUUCAGCAAGGAAAG
CAUCCUGCCGAAGAGAAACAGCGACAAGCUGA
UCGCAAGAAAGAAGGACUGGGACCCGAAGAAG
UACGGAGGAUUCGACAGCCCGACAGUCGCAUA
CAGCGUCCUGGUCGUCGCAAAGGUCGAAAAGG
GAAAGAGCAAGAAGCUGAAGAGCGUCAAGGAA
CUGCUGGGAAUCACAAUCAUGGAAAGAAGCAG
CUUCGAAAAGAACCCGAUCGACUUCUGGAAG
CAAAGGGAUACAAGGAAGUCAAGAAGGACCUG
AUCAUCAAGCUGCCGAAGUACAGCCUGUUCGA
ACUGGAAAACGGAAGAAAGAGAAUGCUGGCAA
GCGCAGGAGAACUGCAGAAGGGAAACGAACUG
GCACUGCCGAGCAAGUACGUCAACUUCUGUA
CCUGGCAAGCCACUACGAAAAGCUGAAGGGAA
GCCCCGAAGACAACGAACAGAAGCAGCUGUUC
GUCGAACAGCACAAGCACUACCUGGACGAAAU
CAUCGAACAGAUCAGCGAAUUCAGCAAGAGAG
UCAUCCUGGCAGACGCAAACCUGGACAAGGUC
CUGAGCGCAUACAACAAGCACAGAGACAAGCC
GAUCAGAGAACAGGCAGAAAACAUCAUCCACC

	<p>UGUUCACACUGACAAACCUGGGAGCACCGGCA GCAUUCAAGUACUUCGACACAACAAUCGACAG AAAGAGAUACACAAGCACAAAGGAAGUCCUGG ACGCAACACUGAUCCACCAGAGCAUCACAGGA CUGUACGAAACAAGAAUCGACCUGAGCCAGCU GGGAGGAGACGGAGGAGGAAGCCCGAAGAAGA AGAGAAAGGUCCCGAAGAAGAAGAGAAAGGUC GGAAGCGGAAGCCCGAAGAAGAAGAGAAAGGU CGACGGAAGCCCGAAGAAGAAGAGAAAGGUCG ACAGCGGAUAG</p>	
<p>Кодирующая последовательность Cas 9, которая кодирует SEQ ID № 222, использующая минимальные кодоны уридина (но не старт или стоп кодоны, уместные для включения в последовательность, кодирующую гибридный белок)</p>	<p>GACAAGAAGUACAGCAUCGGACUGGACAUCGG AACAAACAGCGUCGGAUGGGCAGUCAUCACAG ACGAAUACAAGGUCCCGAGCAAGAAGUUCAAG GUCCUGGGAAACACAGACAGACACAGCAUCAA GAAGAACCUGAUUCGGAGCACUGCUGUUCGACA GCGGAGAAACAGCAGAAGCAACAAGACUGAAG AGAACAGCAAGAAGAAGAUACACAAGAAGAAA GAACAGAAUCUGCUACCUGCAGGAAAUCUUCA GCAACGAAAUGGCAAAGGUCGACGACAGCUUC UUCCACAGACUGGAAGAAAGCUUCCUGGUCGA AGAAGACAAGAAGCACGAAAGACACCCGAUCU UCGGAAACAUCGUCGACGAAGUCGCAUACCAC GAAAAGUACCCGACAAUCUACCACCUGAGAAA GAAGCUGGUCGACAGCACAGACAAGGCAGACC UGAGACUGAUCUACCUGGCACUGGCACACAUG AUCAAGUUCAGAGGACACUCCUGAUCGAAGG AGACCUGAACCCGGACAACAGCGACGUCGACA AGCUGUUCAUCCAGCUGGUCCAGACAUACAAC CAGCUGUUCGAAGAAAACCCGAUCAACGCAAG CGGAGUCGACGCAAAGGCAAUCCUGAGCGCAA GACUGAGCAAGAGCAGAAGACUGGAAAACCUG AUCGCACAGCUGCCGGGAGAAAAGAAGAACGG ACUGUUCGGAAACCUGAUCGCACUGAGCCUGG GACUGACACCGAACUUCAAGAGCAACUUCGAC CUGGCAGAAGACGCAAAGCUGCAGCUGAGCAA</p>	<p>224</p>

GGACACAUACGACGACGACCUGGACAACCUGC
UGGCACAGAUCCGGAGACCAGUACGCAGACCUG
UCCUGGCAGCAAAGAACCUGAGCGACGCAAU
CCUGCUGAGCGACAUCCUGAGAGUCAACACAG
AAAUCACAAAGGCACCGCUGAGCGCAAGCAUG
AUCAAGAGAUACGACGAACACCACCAGGACCU
GACACUGCUGAAGGCACUGGUCAGACAGCAGC
UGCCGGAAAAGUACAAGGAAAUCUUCUUCGAC
CAGAGCAAGAACGGAUACGCAGGAUACAUCGA
CGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAAUUCUACAAGU
UCAUCAAGCCGAUCCUGGAAAAGAUGGACGGA
ACAGAAGAACUGCUGGUCAAGCUGAACAGAGA
AGACCUGCUGAGAAAGCAGAGAACAUCGACA
ACGGAAGCAUCCCGCACCCAGAUCCACCUGGGA
GAACUGCACGCAAUCCUGAGAAGACAGGAAGA
CUUCUACCCGUUCCUGAAGGACAACAGAGAAA
AGAUCGAAAAGAUCUGACAUCAGAAUCCCG
UACUACGUCGGACCGCUGGCAAGAGGAAACAG
CAGAUUCGCAUGGAUGACAAGAAAGAGCGAAG
AAACAAUCACACCGUGGAACUUCGAAGAAGUC
GUCGACAAGGGAGCAAGCGCACAGAGCUUCAU
CGAAAGAAUGACAAACUUCGACAAGAACCUGC
CGAACGAAAAGGUCCUGCCGAAGCACAGCCUG
CUGUACGAAUACUUCACAGUCUACAACGAACU
GACAAAGGUCAAGUACGUCACAGAAGGAAUGA
GAAAGCCGGCAUCCUGAGCGGAGAACAGAAG
AAGGCAAUCGUCGACCUGCUGUUCAAGACAAA
CAGAAAGGUCACAGUCAAGCAGCUGAAGGAAG
ACUACUUCAAGAAGAUCGAAUGCUUCGACAGC
GUCGAAAUCAGCGGAGUCGAAGACAGAUUCA
CGCAAGCCUGGGAACAUAACCACGACCUGCUGA
AGAUCAUCAAGGACAAGGACUCCUGGACAAC
GAAGAAAACGAAGACAUCCUGGAAGACAUCGU
CCUGACACUGACACUGUUCGAAGACAGAGAAA
UGAUCGAAGAAAGACUGAAGACAUAACGCACAC

CUGUUCGACGACAAGGUCAUGAAGCAGCUGAA
GAGAAGAAGAUACACAGGAUGGGGAAGACUG
AGCAGAAAGCUGAUCACGGAAUCAGAGACAA
GCAGAGCGGAAAGACAAUCCUGGACUCCUGA
AGAGCGACGGAUUCGCAAACAGAAACUUCAUG
CAGCUGAUCCACGACGACAGCCUGACAUUCAA
GGAAGACAUCCAGAAGGCACAGGUCAGCGGAC
AGGGAGACAGCCUGCACGAACACAUCGCAAAC
CUGGCAGGAAGCCCGGCAAUCAAGAAGGGAAU
CCUGCAGACAGUCAAGGUCGUCGACGAACUGG
UCAAGGUCAUGGGAAGACACAAGCCGGAAAAC
AUCGUCAUCGAAAUGGCAAGAGAAAACCAGAC
AACACAGAAGGGACAGAAGAACAGCAGAGAAA
GAAUGAAGAGAAUCGAAGAAGGAAUCAAGGA
ACUGGGAAGCCAGAUCUGAAGGAACACCCGG
UCGAAAACACACAGCUGCAGAACGAAAAGCUG
UACCUGUACUACCUGCAGAACGGAAGAGACAU
GUACGUCGACCAGGAACUGGACAUCAACAGAC
UGAGCGACUACGACGUCGACCACAUCGUCCG
CAGAGCUUCCUGAAGGACGACAGCAUCGACAA
CAAGGUCCUGACAAGAAGCGACAAGAACAGAG
GAAAGAGCGACAACGUCCCGAGCGAAGAAGUC
GUCAAGAAGAUGAAGAACUACUGGAGACAGCU
GCUGAACGCAAAGCUGAUCACACAGAGAAAGU
UCGACAACCUGACAAAGGCAGAGAGAGGAGGA
CUGAGCGAACUGGACAAGGCAGGAUUCAUCA
GAGACAGCUGGUCGAAACAAGACAGAUCACAA
AGCACGUCGCACAGA UCCUGGACAGCAGAAUG
AACACAAAGUACGACGAAAACGACAAGCUGAU
CAGAGAAGUCAAGGUCAUCACACUGAAGAGCA
AGCUGGUCAGCGACUUCAGAAAGGACUCCAG
UUCUACAAGGUCAGAGAAAUCAACAACUACCA
CCACGCACACGACGCAUACCUGAACGCAGUCG
UCGGAACAGCACUGAUCAAGAAGUACCCGAAG
CUGGAAAGCGAAUUCGUCUACGGAGACUACAA

GGUCUACGACGUCAGAAAGAUGAUCGCAAAGA
GCGAACAGGAAAUCGGAAAGGCAACAGCAAAG
UACUUCUUCUACAGCAACAUCAUGAACUUCUU
CAAGACAGAAAUCACACUGGCAAACGGAGAAA
UCAGAAAGAGACCGCUGAUCGAAACAAACGGA
GAAACAGGAGAAAUCGUCUGGGACAAGGGAAG
AGACUUCGCAACAGUCAGAAAGGUCCUGAGCA
UGCCGCAGGUCAACAUCGUCAAGAAGACAGAA
GUCCAGACAGGAGGAUUCAGCAAGGAAAGCAU
CCUGCCGAAGAGAAACAGCGACAAGCUGAUCG
CAAGAAAGAAGGACUGGGACCCGAAGAAGUAC
GGAGGAUUCGACAGCCCGACAGUCGCAUACAG
CGUCCUGGUCGUCGCAAAGGUCGAAAAGGGAA
AGAGCAAGAAGCUGAAGAGCGUCAAGGAACUG
CUGGGAAUCACAAUCAUGGAAAGAAGCAGCUU
CGAAAAGAACCCGAUCGACUUCUGGAAGCAA
AGGGAUACAAGGAAGUCAAGAAGGACCUGAUC
AUCAAGCUGCCGAAGUACAGCCUGUUCGAACU
GGAAAACGGAAGAAAGAGAAUGCUGGCAAGCG
CAGGAGAACUGCAGAAGGGAAACGAACUGGCA
CUGCCGAGCAAGUACGUCAACUUCUGUACCU
GGCAAGCCACUACGAAAAGCUGAAGGGAAAGCC
CGGAAGACAACGAACAGAAGCAGCUGUUCGUC
GAACAGCACAAGCACUACCUGGACGAAAUCAU
CGAACAGAUUCAGCGAAUUCAGCAAGAGAGUCA
UCCUGGCAGACGCAAACCUGGACAAGGUCCUG
AGCGCAUACAACAAGCACAGAGACAAGCCGAU
CAGAGAACAGGCAGAAAACAUCAUCCACCUGU
UCACACUGACAAACCUGGGAGCACCGGCAGCA
UUCAAGUACUUCGACACAACAAUCGACAGAAA
GAGAUACACAAGCACAAAGGAAGUCCUGGACG
CAACACUGAUCCACCAGAGCAUCACAGGACUG
UACGAAACAAGAAUCGACCUGAGCCAGCUGGG
AGGAGACGGAGGAGGAAGCCCGAAGAAGAAGA
GAAAGGUCCCGAAGAAGAAGAGAAAGGUC

	<p>GGAAGCGGAAGCCCGAAGAAGAAGAGAAAGGU CGACGGAAGCCCGAAGAAGAAGAGAAAGGUCG ACAGCGGA</p>	
<p>Аминокислотная последовательность Cas 9 никазы с двумя сигналами ядерной локализации, в качестве С-терминальных аминокислот</p>	<p>MDKKYSIGLAIGTNSVGWAVITDEYKVPSSKFKV LGNTDRHSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTAR RRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSSFFHRLEES FLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLR KKLVDSTDKADLRLIYLALAHMIKFRGHFLIEGDL NPDNSDVDFLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAK AILSARLSKSRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALS LGLTPNFKSNFDLAEDAQLSKDQYDDDLNLL AQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKA PLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEI FFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDG TEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELH AILRRQEDFYPFKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLA RGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEEVVDKGASAQS FIERMTNFDKNLPNEKVLPHSLLYEYFTVYNELT KVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKV TVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTY HDLLKIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDRE MIEERLKYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLS RKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANRNFMQLIH DDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAI KKGILQTVKVVDDELVKVMGRHKPENIVIAMAREN QTTQKGQKNSRERMKRIEELGKELGSQILKEHPVE NTQLQNEKLYLYLQNGRDMYVDQELDINRLSD YDVDHIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDN VPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTK AERGGLSELDKAGFIKQQLVETRQITKHVAQILDS RMNTKYDENDKLIREVKVITLKSCLVSDFRKDFQF YKVVREINNYHHAHDAYLNAVVGTAIIKKYPKLES EFVYGDYKVVYDVRKMIKSEIQEIGKATAKYFFYS NIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDK GRDFATVRKVLSPQVNVKKTQVQGGFSKESIL</p>	<p>225</p>

	<p>PKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLV VAKVEK GKSKKLKSVKELLGITIMERSSEKPNIDF LEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLAS AGELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLGKSPE DNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVILADAN LDKVL SAYNKHRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAP AAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQ SITGLYE TRIDLSQLGGD GSGSPKKKRKVDGSPKKKRKVDS G</p>	
<p>ORF мРНК Cas 9 никазы, кодирующая SEQ ID №: 25, используя минимальные кодоны уридина, которые перечислены в Таблице 3, со старт и стоп кодонами</p>	<p>AUGGACAAGAAGUACAGCAUCGGACUGGCAAU CGGAACAAACAGCGUCGGAUGGGCAGUCAUCA CAGACGAAUACAAGGUCCCGAGCAAGAAGUUC AAGGUCCUGGGAACACAGACAGACACAGCAU CAAGAAGAACCUGAUCGGAGCACUGCUGUUCG ACAGCGGAGAAACAGCAGAAGCAACAAGACUG AAGAGAACAGCAAGAAGAAGAUACACAAGAAG AAAGAACAGAAUCUGCUACCUGCAGGAAAUCU UCAGCAACGAAAUGGCAAAGGUCGACGACAGC UUCUCCACAGACUGGAAGAAAGCUUCCUGGU CGAAGAAGACAAGAAGCACGAAAGACACCCGA UCUUCGGAAACAUCGUCGACGAAGUCGCAUAC CACGAAAAGUACCCGACAAUCUACCACCUGAG AAAGAAGCUGGUCGACAGCACAGACAAGGCAG ACCUGAGACUGAUCUACCUGGCACUGGCACAC AUGAUCAAGUUCAGAGGACACUCCUGAUCGA AGGAGACCUGAACCCGGACAACAGCGACGUCG ACAAGCUGUUCAUCCAGCUGGUCCAGACAUAC AACCAGCUGUUCGAAGAAAACCCGAUCAACGC AAGCGGAGUCGACGCAAAGGCAAUCCUGAGCG CAAGACUGAGCAAGAGCAGAAGACUGGAAAAC CUGAUCGCACAGCUGCCGGGAGAAAAGAAGAA CGGACUGUUCGGAACCUGAUCGCACUGAGCC UGGGACUGACACCGAACUUCAAGAGCAACUUC GACCUGGCAGAAGACGCAAAGCUGCAGCUGAG CAAGGACACAUACGACGACGACCUGGACAACC</p>	<p>226</p>

UGCUGGCACAGAUCGGAGACCAGUACGCAGAC
CUGUUCCUGGCAGCAAAGAACCUGAGCGACGC
AAUCCUGCUGAGCGACAUCCUGAGAGUCAACA
CAGAAAUCACAAAGGCACCGCUGAGCGCAAGC
AUGAUCAAGAGAUACGACGAACACCACCAGGA
CCUGACACUGCUGAAGGCACUGGUCAGACAGC
AGCUGCCGGAAAAGUACAAGGAAAUCUUCUUC
GACCAGAGCAAGAACGGAUACGCAGGAUACAU
CGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAAUUCUACA
AGUUCAUCAAGCCGAUCCUGGAAAAGAUGGAC
GGAACAGAAGAACUGCUGGUCAAGCUGAACAG
AGAAGACCUGCUGAGAAAGCAGAGAACAUUCG
ACAACGGAAGCAUCCCGCACCAGAUCACCUG
GGAGAACUGCACGCAAUCCUGAGAAGACAGGA
AGACUUCUACCCGUUCCUGAAGGACAACAGAG
AAAAGAUCGAAAAGAUCUGACAUCAGAAUC
CCGUACUACGUCGGACCGCUGGCAAGAGGAAA
CAGCAGAUUCGCAUGGAUGACAAGAAAGAGCG
AAGAAACAUCACACCGUGGAACUUCGAAGAA
GUCGUCGACAAGGGAGCAAGCGCACAGAGCUU
CAUCGAAAGAAUGACAAACUUCGACAAGAACC
UGCCGAACGAAAAGGUCCUGCCGAAGCACAGC
CUGCUGUACGAAUACUUCACAGUCUACAACGA
ACUGACAAAGGUCAAGUACGUCACAGAAGGAA
UGAGAAAGCCGGCAUUCUGAGCGGAGAACAG
AAGAAGGCAAUCGUCGACCUGCUGUUCAAGAC
AAACAGAAAGGUCACAGUCAAGCAGCUGAAGG
AAGACUACUUCAAGAAGAUCGAAUGCUUCGAC
AGCGUCGAAAUCAGCGGAGUCGAAGACAGAUU
CAACGCAAGCCUGGGAACAUACCACGACCUGC
UGAAGAUCAUCAAGGACAAGGACUUCUGGAC
AACGAAGAAAACGAAGACAUCCUGGAAGACAU
CGUCCUGACACUGACACUGUUCGAAGACAGAG
AAAUGAUCGAAGAAAGACUGAAGACAUACGCA
CACCUGUUCGACGACAAGGUCAUGAAGCAGCU

GAAGAGAAGAAGAUACACAGGAUGGGGAAGA
CUGAGCAGAAAGCUGAUCAACGGAAUCAGAGA
CAAGCAGAGCGGAAAGACAAUCCUGGACUUC
UGAAGAGCGACGGAUUCGCAAACAGAAACUUC
AUGCAGCUGAUCCACGACGACAGCCUGACA
CAAGGAAGACAUCCAGAAGGCACAGGUCAGCG
GACAGGGAGACAGCCUGCACGAACACAUCGCA
AACCUGGCAGGAAGCCCGGCAAUCAAGAAGGG
AAUCCUGCAGACAGUCAAGGUCGUCGACGAAC
UGGUCAAGGUCAUGGGAAGACACAAGCCGGAA
ACAUCGUCAUCGAAAUGGCAAGAGAAAACCA
GACAACACAGAAGGGACAGAAGAACAGCAGAG
AAAGAAUGAAGAGAAUCGAAGAAGGAAUCA
GGAACUGGGAAGCCAGAUCCUGAAGGAACACC
CGGUCGAAAACACACAGCUGCAGAACGAAAAG
CUGUACCUGUACUACCUGCAGAACGGAAGAGA
CAUGUACGUCGACCAGGAACUGGACAUCAACA
GACUGAGCGACUACGACGUCGACCACAUCGUC
CCGCAGAGCUUCCUGAAGGACGACAGCAUCGA
CAACAAGGUCCUGACAAGAAGCGACAAGAACA
GAGGAAAGAGCGACAACGUCCCGAGCGAAGAA
GUCGUCAAGAAGAUGAAGAACUACUGGAGACA
GCUGCUGAACGCAAAGCUGAUCACACAGAGAA
AGUUCGACAACCUGACAAAGGCAGAGAGAGGA
GGACUGAGCGAACUGGACAAGGCAGGAUUCAU
CAAGAGACAGCUGGUCGAAACAAGACAGAUCA
CAAAGCACGUCGCACAGAUCUGGACAGCAGA
AUGAACACAAAGUACGACGAAAACGACAAGCU
GAUCAGAGAAGUCAAGGUCAUCACACUGAAGA
GCAAGCUGGUCAGCGACUUCAGAAAGGACUUC
CAGUUCUACAAGGUCAGAGAAAUCAACAACUA
CCACCACGCACACGACGCAUACCUGAACGCAG
UCGUCGGAACAGCACUGAUCAAGAAGUACCCG
AAGCUGGAAAGCGAAUUCGUCUACGGAGACUA
CAAGGUCUACGACGUCAGAAAGAUGAUCGCAA

AGAGCGAACAGGAAAUCGGAAAGGCAACAGCA
AAGUACUUCUUCUACAGCAACAUCAUGAACUU
CUUCAAGACAGAAAUCACACUGGCAAACGGAG
AAAUCAGAAAGAGACCGCUGAUCGAAACAAAC
GGAGAAACAGGAGAAAUCGUCUGGGACAAGGG
AAGAGACUUCGCAACAGUCAGAAAGGUCCUGA
GCAUGCCGCAGGUCAACAUCGUCAAGAAGACA
GAAGUCCAGACAGGAGGAUUCAGCAAGGAAAG
CAUCCUGCCGAAGAGAAACAGCGACAAGCUGA
UCGCAAGAAAGAAGGACUGGGACCCGAAGAAG
UACGGAGGAUUCGACAGCCCGACAGUCGCAUA
CAGCGUCCUGGUCGUCGCAAAGGUCGAAAAGG
GAAAGAGCAAGAAGCUGAAGAGCGUCAAGGAA
CUGCUGGGAAUCACAAUCAUGGAAAGAAGCAG
CUUCGAAAAGAACCCGAUCGACUUCUGGAAG
CAAAGGGAUACAAGGAAGUCAAGAAGGACCUG
AUCAUCAAGCUGCCGAAGUACAGCCUGUUCGA
ACUGGAAAACGGAAGAAAGAGAAUGCUGGCAA
GCGCAGGAGAACUGCAGAAGGGAAACGAACUG
GCACUGCCGAGCAAGUACGUCAACUUCUGUA
CCUGGCAAGCCACUACGAAAAGCUGAAGGGAA
GCCC GGAAGACAACGAACAGAAGCAGCUGUUC
GUCGAACAGCACAAGCACUACCUGGACGAAAU
CAUCGAACAGAUCAGCGAAUUCAGCAAGAGAG
UCAUCCUGGCAGACGCAAACCUGGACAAGGUC
CUGAGCGCAUACAACAAGCACAGAGACAAGCC
GAUCAGAGAACAGGCAGAAAACAUCAUCCACC
UGUUCACACUGACAAACCUGGGAGCACCGGCA
GCAUUCAAGUACUUCGACACAACAAUCGACAG
AAAGAGAUACACAAGCACAAAGGAAGUCCUGG
ACGCAACACUGAUCCACCAGAGCAUCACAGGA
CUGUACGAAACAAGAAUCGACCUGAGCCAGCU
GGGAGGAGACGGAAGCGGAAGCCCGAAGAAGA
AGAGAAAGGUCGACGGAAGCCCGAAGAAGAAG
AGAAAGGUCGACAGCGGAUAG

Последовательность,
 кодирующая Cas 9
 никазу, кодирующую
 SEQ ID №: 25,
 используя
 минимальные кодоны
 уридина (не старт или
 стоп кодоны, уместные
 для включения
 последовательности,
 которую кодирует
 гибридный белок)

GACAAGAAGUACAGCAUCGGACUGGCAAUCGG
 AACAAACAGCGUCGGAUGGGCAGUCAUCACAG
 ACGAAUACAAGGUCCCGAGCAAGAAGUUCAAG
 GUCCUGGGAAACACAGACAGACACAGCAUCAA
 GAAGAACCUGAUCGGAGCACUGCUGUUCGACA
 GCGGAGAAACAGCAGAAGCAACAAGACUGAAG
 AGAACAGCAAGAAGAAGAUACACAAGAAGAAA
 GAACAGAAUCUGCUACCUGCAGGAAAUCUUCA
 GCAACGAAAUGGCAAAGGUCGACGACAGCUUC
 UUCCACAGACUGGAAGAAAGCUUCCUGGUCGA
 AGAAGACAAGAAGCACGAAAGACACCCGAUCU
 UCGGAAACAUCGUCGACGAAGUCGCAUACCAC
 GAAAAGUACCCGACAAUCUACCACCUGAGAAA
 GAAGCUGGUCGACAGCACAGACAAGGCAGACC
 UGAGACUGAUCUACCUGGCACUGGCACACAUG
 AUCAAGUUCAGAGGACACUUCCUGAUCGAAGG
 AGACCUGAACCCGGACAACAGCGACGUCGACA
 AGCUGUUCAUCCAGCUGGUCCAGACAUACAAC
 CAGCUGUUCGAAGAAAACCCGAUCAACGCAAG
 CGGAGUCGACGCAAAGGCAAUCCUGAGCGCAA
 GACUGAGCAAGAGCAGAAGACUGGAAAACCUG
 AUCGCACAGCUGCCGGGAGAAAAGAAGAACGG
 ACUGUUCGGAAACCUGAUCGCACUGAGCCUGG
 GACUGACACCGAACUUCAAGAGCAACUUCGAC
 CUGGCAGAAGACGCAAAGCUGCAGCUGAGCAA
 GGACACAUACGACGACGACCUGGACAACCUGC
 UGGCACAGAUCCGGAGACCAGUACGCAGACCUG
 UUCCUGGCAGCAAAGAACCUGAGCGACGCAAU
 CCUGCUGAGCGACAUCCUGAGAGUCAACACAG
 AAAUCACAAAGGCACCGCUGAGCGCAAGCAUG
 AUCAAGAGAUACGACGAACACCACCAGGACCU
 GACACUGCUGAAGGCACUGGUCAGACAGCAGC
 UGCCGAAAAGUACAAGGAAAUCUUCUUCGAC
 CAGAGCAAGAACGGAUACGCAGGAUACAUCGA
 CGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAAUUCUACAAGU

227

UCAUCAAGCCGAUCCUGGAAAAGAUGGACGGA
ACAGAAGAACUGCUGGUCAAGCUGAACAGAGA
AGACCUGCUGAGAAAGCAGAGAACAUCGACA
ACGGAAGCAUCCCGCACCAGAUCACCUGGGA
GAACUGCACGCAAUCCUGAGAAGACAGGAAGA
CUUCUACCCGUUCCUGAAGGACAACAGAGAAA
AGAUCGAAAAGAUCUGACAUCAGAAUCCCG
UACUACGUCGGACCGCUGGCAAGAGGAAACAG
CAGAUUCGCAUGGAUGACAAGAAAGAGCGAAG
AAACAUCACACCGUGGAACUUCGAAGAAGUC
GUCGACAAGGGAGCAAGCGCACAGAGCUUCAU
CGAAAGAAUGACAAACUUCGACAAGAACCUGC
CGAACGAAAAGGUCCUGCCGAAGCACAGCCUG
CUGUACGAAUACUUCACAGUCUACAACGAACU
GACAAAGGUCAAGUACGUCACAGAAGGAAUGA
GAAAGCCGGCAUUCUGAGCGGAGAACAGAAG
AAGGCAAUCGUCGACCUGCUGUUCAAGACAAA
CAGAAAGGUCACAGUCAAGCAGCUGAAGGAAG
ACUACUUCAAGAAGAUCGAAUGCUUCGACAGC
GUCGAAAUCAGCGGAGUCGAAGACAGAUUCA
CGCAAGCCUGGGAACAUACCACGACCUGCUGA
AGAUCAUCAAGGACAAGGACUCCUGGACAAC
GAAGAAAACGAAGACAUCCUGGAAGACAUCGU
CCUGACACUGACACUGUUCGAAGACAGAGAAA
UGAUCGAAGAAAGACUGAAGACAUACGCACAC
CUGUUCGACGACAAGGUCAUGAAGCAGCUGAA
GAGAAGAAGAUACACAGGAUGGGGAAGACUG
AGCAGAAAGCUGAUCAACGGAAUCAGAGACAA
GCAGAGCGGAAAGACAAUCCUGGACUCCUGA
AGAGCGACGGAUUCGCAAACAGAAACUUCAUG
CAGCUGAUCCACGACGACAGCCUGACAUCUCAA
GGAAGACAUCCAGAAGGCACAGGUCAGCGGAC
AGGGAGACAGCCUGCACGAACACAUCGCAAAC
CUGGCAGGAAGCCCGGCAAUCAAGAAGGGAAU
CCUGCAGACAGUCAAGGUCGUCGACGAACUGG

UCAAGGUCAUGGGAAGACACAAGCCGGAAAAC
AUCGUCAUCGAAAUGGCAAGAGAAAACCAGAC
AACACAGAAGGGACAGAAGAACAGCAGAGAAA
GAAUGAAGAGAAUCGAAGAAGGAAUCAAGGA
ACUGGGAAGCCAGAUCCUGAAGGAACACCCGG
UCGAAAACACACAGCUGCAGAACGAAAAGCUG
UACCUGUACUACCUGCAGAACGGAAGAGACAU
GUACGUCGACCAGGAACUGGACAUCAACAGAC
UGAGCGACUACGACGUCGACCACAUCGUCCG
CAGAGCUUCCUGAAGGACGACAGCAUCGACAA
CAAGGUCCUGACAAGAAGCGACAAGAACAGAG
GAAAGAGCGACAACGUCCCGAGCGAAGAAGUC
GUCAAGAAGAUGAAGAACUACUGGAGACAGCU
GCUGAACGCAAAGCUGAUCACACAGAGAAAGU
UCGACAACCUGACAAAGGCAGAGAGAGGAGGA
CUGAGCGAACUGGACAAGGCAGGAUUCAUCAA
GAGACAGCUGGUCGAAACAAGACAGAUCACAA
AGCACGUCGCACAGAUCUGGACAGCAGAAUG
AACACAAAGUACGACGAAAACGACAAGCUGAU
CAGAGAAGUCAAGGUCAUCACACUGAAGAGCA
AGCUGGUCAGCGACUUCAGAAAGGACUCCAG
UUCUACAAGGUCAGAGAAAUCAACAACUACCA
CCACGCACACGACGCAUACCUGAACGCAGUCG
UCGGAACAGCACUGAUCAAGAAGUACCCGAAG
CUGGAAAGCGAAUUCGUCUACGGAGACUACAA
GGUCUACGACGUCAGAAAGAUGAUCGCAAAGA
GCGAACAGGAAAUCGGAAAGGCAACAGCAAAG
UACUUCUUCUACAGCAACAUCAUGAACUUCU
CAAGACAGAAAUCACACUGGCAAACGGAGAAA
UCAGAAAGAGACCGCUGAUCGAAACAAACGGA
GAAACAGGAGAAAUCGUCUGGGACAAGGGAAG
AGACUUCGCAACAGUCAGAAAGGUCCUGAGCA
UGCCGCAGGUCAACAUCGUCAAGAAGACAGAA
GUCCAGACAGGAGGAUUCAGCAAGGAAAGCAU
CCUGCCGAAGAGAAACAGCGACAAGCUGAUCG

	<p>CAAGAAAGAAGGACUGGGACCCGAAGAAGUAC GGAGGAUUCGACAGCCCGACAGUCGCAUACAG CGUCCUGGUCGUCGCAAAGGUCGAAAAGGGAA AGAGCAAGAAGCUGAAGAGCGUCAAGGAACUG CUGGGAAUCACAAUCAUGGAAAGAAGCAGCUU CGAAAAGAACCCGAUCGACUUCUGGAAGCAA AGGGAUACAAGGAAGUCAAGAAGGACCUGAUC AUCAAGCUGCCGAAGUACAGCCUGUUCGAACU GGAAAACGGAAGAAAGAGAAUGCUGGCAAGCG CAGGAGAACUGCAGAAGGGAAACGAACUGGCA CUGCCGAGCAAGUACGUCAACUUCUGUACCU GGCAAGCCACUACGAAAAGCUGAAGGGAAGCC CGGAAGACAACGAACAGAAGCAGCUGUUCGUC GAACAGCACAAGCACUACCUGGACGAAAUCAU CGAACAGAUCAGCGAAUUCAGCAAGAGAGUCA UCCUGGCAGACGCAAACCUGGACAAGGUCCUG AGCGCAUACAACAAGCACAGAGACAAGCCGAU CAGAGAACAGGCAGAAAACAUCAUCCACCUGU UCACACUGACAAACCUGGGAGCACCCGGCAGCA UUCAAGUACUUCGACACAACAUCGACAGAAA GAGAUACACAAGCACAAAGGAAGUCCUGGACG CAACACUGAUCCACCAGAGCAUCACAGGACUG UACGAAACAAGAAUCGACCUGAGCCAGCUGGG AGGAGAC GGAAGCGGAAGCCCGAAGAAGAAGAGAAAGGU CGACGGAAGCCCGAAGAAGAAGAGAAAGGUCG ACAGCGGA</p>	
<p>Аминокислотная последовательность dCas 9 с двумя сигналами ядерной локализации в качестве С-терминальных аминокислот</p>	<p>MDKKYSIGLAIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKV LGNTDRHSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTAR RRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSSFFHRLEES FLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLR KKLVDSTDKADLRLIYLALAHMIKFRGHFLIEGDL NPDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAK AILSARLSKSRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALS LGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLNLL</p>	228

AQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKA
 PLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEI
 FFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDG
 TEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELH
 AILRRQEDFYFPLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLA
 RGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEEVVDKGASAQS
 FIERMTNFDKNLPNEKVLPHSLLYEYFTVYNELT
 KVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKV
 TVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTY
 HDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDRE
 MIEERLKYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLS
 RKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANRNFMLIH
 DDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAI
 KKGILQTVKVVDDELVKVMGRHKPENIVIEMAREN
 QTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQILKEHPVE
 NTQLQNEKLYLYLQNGRDMYVDQELDINRLSD
 YDVDAIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDN
 VPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTK
 AERGGELSEDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDS
 RMNTKYDENDKLIREVKVITLKSKLVSDFRKDFQF
 YK VREINNYHHAHDAYLNAVVGTA LIKKYPKLES
 EFVYGDYK VYDVRKMIAKSEQEIGKATAKYFFYS
 NIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDK
 GRDFATVRKVL SMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESIL
 PKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLV
 VAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIMERSSEFEKNPIDF
 LEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLAS
 AGELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLGKSPE
 DNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVLADAN
 LDKVLSAYNKHRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAP
 AAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVL DATLIHQ SITGLYE
 TRIDLSQLGGDGS SPKKKRKVDGSPKKKRKVDS
 G

ORF мРНК dCas 9,
 кодирующая SEQ ID №:

AUGGACAAGAAGUACAGCAUCGGACUGGCAAU
 CGGAACAAACAGCGUCGGAUGGGCAGUCAUCA

229

<p>228, используя минимальные кодоны уридина со старт и стоп кодонами</p>	<p>CAGACGAAUACAAGGUCCCGAGCAAGAAGUUC AAGGUCCUGGGAAACACAGACAGACACAGCAU CAAGAAGAACCUGAUCGGAGCACUGCUGUUCG ACAGCGGAGAAACAGCAGAAGCAACAAGACUG AAGAGAACAGCAAGAAGAAGAUACACAAGAAG AAAGAACAGAAUCUGCUACCUGCAGGAAAUCU UCAGCAACGAAAUGGCAAAGGUCGACGACAGC UUCUUCCACAGACUGGAAGAAAGCUUCCUGGU CGAAGAAGACAAGAAGCACGAAAGACACCCGA UCUUCGGAAACAUCGUCGACGAAGUCGCAUAC CACGAAAAGUACCCGACAAUCUACCACCUGAG AAAGAAGCUGGUCGACAGCACAGACAAGGCAG ACCUGAGACUGAUCUACCUGGCACUGGCACAC AUGAUCAAGUUCAGAGGACACUUCCUGAUCGA AGGAGACCUGAACCCGGACAACAGCGACGUCG ACAAGCUGUUCAUCCAGCUGGUCCAGACAUAC AACCAGCUGUUCGAAGAAAACCCGAUCAACGC AAGCGGAGUCGACGCAAAGGCAAUCCUGAGCG CAAGACUGAGCAAGAGCAGAAGACUGGAAAAC CUGAUCGCACAGCUGCCGGGAGAAAAGAAGAA CGGACUGUUCGGAAACCUGAUCGCACUGAGCC UGGGACUGACACCGAACUUCAAGAGCAACUUC GACCUGGCAGAAGACGCAAAGCUGCAGCUGAG CAAGGACACAUACGACGACGACCUGGACAACC UGCUGGCACAGAUCGGAGACCAGUACGCAGAC CUGUUCCUGGCAGCAAAGAACCUGAGCGACGC AAUCCUGCUGAGCGACAUCCUGAGAGUCAACA CAGAAAUCACAAAGGCACCGCUGAGCGCAAGC AUGAUCAAGAGAUACGACGAACACCACCAGGA CCUGACACUGCUGAAGGCACUGGUCAGACAGC AGCUGCCGGAAAAGUACAAGGAAAUCUUCUUC GACCAGAGCAAGAACGGAUACGCAGGAUACAU CGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAAUUCUACA AGUUCAUCAAGCCGAUCCUGGAAAAGAUGGAC GGAACAGAAGAACUGCUGGUCAAGCUGAACAG</p>
---	---

AGAAGACCUGCUGAGAAAGCAGAGAACAUUCG
ACAACGGAAGCAUCCCGCACCAGAUCCACCUG
GGAGAACUGCACGCAAUCCUGAGAAGACAGGA
AGACUUCUACCCGUUCCUGAAGGACAACAGAG
AAAAGAUCGAAAAGAUCUGACAUUCAGAAUC
CCGUACUACGUCGGACCGCUGGCAAGAGGAAA
CAGCAGAUUCGCAUGGAUGACAAGAAAGAGCG
AAGAAACAAUCACACCGUGGAACUUCGAAGAA
GUCGUCGACAAGGGAGCAAGCGCACAGAGCUU
CAUCGAAAGAAUGACAAACUUCGACAAGAACC
UGCCGAACGAAAAGGUCCUGCCGAAGCACAGC
CUGCUGUACGAAUACUUCACAGUCUACAACGA
ACUGACAAAGGUCAAGUACGUCACAGAAGGAA
UGAGAAAGCCGGCAUUCCUGAGCGGAGAACAG
AAGAAGGCAAUCGUCGACCUGCUGUUCAAGAC
AAACAGAAAGGUCACAGUCAAGCAGCUGAAGG
AAGACUACUUCAAGAAGAUCGAAUGCUUCGAC
AGCGUCGAAAUCAGCGGAGUCGAAGACAGAUU
CAACGCAAGCCUGGGAACAUAACCACGACCUGC
UGAAGAUCAUCAAGGACAAGGACUUCCUGGAC
AACGAAGAAAACGAAGACAUCCUGGAAGACAU
CGUCCUGACACUGACACUGUUCGAAGACAGAG
AAAUGAUCGAAGAAAGACUGAAGACAUACGCA
CACCUGUUCGACGACAAGGUCAUGAAGCAGCU
GAAGAGAAGAAGAUACACAGGAUGGGGAAGA
CUGAGCAGAAAGCUGAUCAACGGAAUCAGAGA
CAAGCAGAGCGGAAAGACAAUCCUGGACUUC
UGAAGAGCGACGGAUUCGCAAACAGAAACUUC
AUGCAGCUGAUCCACGACGACAGCCUGACAUI
CAAGGAAGACAUCCAGAAGGCACAGGUCAGCG
GACAGGGAGACAGCCUGCACGAACACAUCGCA
AACCUGGCAGGAAGCCCGGCAAUCAAGAAGGG
AAUCCUGCAGACAGUCAAGGUCGUCGACGAAC
UGGUCAAGGUCAUGGGAAGACACAAGCCGGAA
AACAUUCGUCAUCGAAAUGGCAAGAGAAAACCA

GACAACACAGAAGGGACAGAAGAACAGCAGAG
AAAGAAUGAAGAGAAUCGAAGAAGGAAUCAA
GGAACUGGGAAGCCAGA UCCUGAAGGAACACC
CGGUCGAAAACACACAGCUGCAGAACGAAAAG
CUGUACCUGUACUACCUGCAGAACGGAAGAGA
CAUGUACGUCGACCAGGAACUGGACAUCAACA
GACUGAGCGACUACGACGUCGACGCAAUCGUC
CCGCAGAGCUUCCUGAAGGACGACAGCAUCGA
CAACAAGGUCCUGACAAGAAGCGACAAGAACA
GAGGAAAGAGCGACAACGUCCCGAGCGAAGAA
GUCGUCAAGAAGAUGAAGAACUACUGGAGACA
GCUGCUGAACGCAAAGCUGAUCACACAGAGAA
AGUUCGACAACCUGACAAAGGCAGAGAGAGGA
GGACUGAGCGAACUGGACAAGGCAGGAUUCAU
CAAGAGACAGCUGGUCGAAACAAGACAGAUCA
CAAAGCACGUCGCACAGA UCCUGGACAGCAGA
AUGAACACAAAGUACGACGAAAACGACAAGCU
GAUCAGAGAAGUCAAGGUCAUCACACUGAAGA
GCAAGCUGGUCAGCGACUUCAGAAAGGACUUC
CAGUUCUACAAGGUCAGAGAAAUCAACAACUA
CCACCACGCACACGACGCAUACCUGAACGCAG
UCGUCGGAACAGCACUGAUCAAGAAGUACCCG
AAGCUGGAAAGCGAAUUCGUCUACGGAGACUA
CAAGGUCUACGACGUCAGAAAGAUGAUCGCAA
AGAGCGAACAGGAAAUCGGAAAGGCAACAGCA
AAGUACUUCUUCUACAGCAACAUCAUGAACUU
CUUCAAGACAGAAAUCACACUGGCAAACGGAG
AAAUCAGAAAGAGACCGCUGAUCGAAACAAAC
GGAGAAACAGGAGAAAUCGUCUGGGACAAGGG
AAGAGACUUCGCAACAGUCAGAAAGGUCCUGA
GCAUGCCGCAGGUCAACAUCGUCAAGAAGACA
GAAGUCCAGACAGGAGGAUUCAGCAAGGAAAG
CAUCCUGCCGAAGAGAAACAGCGACAAGCUGA
UCGCAAGAAAGAAGGACUGGGACCCGAAGAAG
UACGGAGGAUUCGACAGCCCGACAGUCGCAUA

	<p>CAGCGUCCUGGUCGUCGCAAAGGUCGAAAAGG GAAAGAGCAAGAAGCUGAAGAGCGUCAAGGAA CUGCUGGGAAUCACAAUCAUGGAAAGAAGCAG CUUCGAAAAGAACCCGAUCGACUUCUGGAAG CAAAGGGAUACAAGGAAGUCAAGAAGGACCUG AUCAUCAAGCUGCCGAAGUACAGCCUGUUCGA ACUGGAAAACGGAAGAAAGAGAAUGCUGGCAA GCGCAGGAGAACUGCAGAAGGGAAACGAACUG GCACUGCCGAGCAAGUACGUCAACUUCUGUA CCUGGCAAGCCACUACGAAAAGCUGAAGGGAA GCCC GGAAGACAACGAACAGAAGCAGCUGUUC GUCGAACAGCACAAGCACUACCUGGACGAAU CAUCGAACAGAUCAGCGAAUUCAGCAAGAGAG UCAUCCUGGCAGACGCAAACCUGGACAAGGUC CUGAGCGCAUACAACAAGCACAGAGACAAGCC GAUCAGAGAACAGGCAGAAAACAUCAUCCACC UGUUCACACUGACAAACCUGGGAGCACCGGCA GCAUUCAAGUACUUCGACACAACAUCGACAG AAAGAGAUACACAAGCACAAAGGAAGUCCUGG ACGCAACACUGAUCCACCAGAGCAUCACAGGA CUGUACGAAACAAGAAUCGACCUGAGCCAGCU GGGAGGAGAC GGAAGCGGAAGCCC GAAGAAGAAGAGAAAGGU CGACGGAAGCCC GAAGAAGAAGAGAAAGGUCG ACAGCGGAUAG</p>	
<p>Кодирующая последовательность dCas 9, которая кодирует SEQ ID № 228, используя минимальные кодоны уридина (но не старт или стоп кодоны, уместные для включения в</p>	<p>GACAAGAAGUACAGCAUCGGACUGGCAAUCGG AACAAACAGCGUCGGAUGGGCAGUCAUCACAG ACGAAUACAAGGUCCCGAGCAAGAAGUUCAAG GUCCUGGGAAACACAGACAGACACAGCAUCAA GAAGAACCUGAUCGGAGCACUGCUGUUCGACA GCGGAGAAACAGCAGAAGCAACAAGACUGAAG AGAACAGCAAGAAGAAGAUACACAAGAAGAAA GAACAGAAUCUGCUACCUGCAGGAAAUCUUCA GCAACGAAAUGGCAAAGGUCGACGACAGCUUC UCCACAGACUGGAAGAAAGCUUCCUGGUCGA</p>	<p>230</p>

последовательность,
кодирующую
гибридный белок)

AGAAGACAAGAAGCACGAAAGACACCCGAUCU
UCGGAAACAUCGUCGACGAAGUCGCAUACCAC
GAAAAGUACCCGACAAUCUACCACCUGAGAAA
GAAGCUGGUCGACAGCACAGACAAGGCAGACC
UGAGACUGAUCUACCUGGCACUGGCACACAUG
AUCAAGUUCAGAGGACACUUCCUGAUCGAAGG
AGACCUGAACCCGGACAACAGCGACGUCGACA
AGCUGUUCAUCCAGCUGGUCCAGACAUACAAC
CAGCUGUUCGAAGAAAACCCGAUCAACGCAAG
CGGAGUCGACGCAAAGGCAAUCCUGAGCGCAA
GACUGAGCAAGAGCAGAAGACUGGAAAACCUG
AUCGCACAGCUGCCGGGAGAAAAGAAGAACGG
ACUGUUCGGAAACCUGAUCGCACUGAGCCUGG
GACUGACACCGAACUUCAAGAGCAACUUCGAC
CUGGCAGAAGACGCAAAGCUGCAGCUGAGCAA
GGACACAUACGACGACGACCUGGACAACCUGC
UGGCACAGAUCCGGAGACCAGUACGCAGACCUG
UCCUGGCAGCAAAGAACCUGAGCGACGCAAU
CCUGCUGAGCGACAUCCUGAGAGUCAACACAG
AAAUCACAAAGGCACCGCUGAGCGCAAGCAUG
AUCAAGAGAUACGACGAACACCACCAGGACCU
GACACUGCUGAAGGCACUGGUCAGACAGCAGC
UGCCGGAAAAGUACAAGGAAAUCUUCUUCGAC
CAGAGCAAGAACGGAUACGCAGGAUACAUCGA
CGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAAUUCUACAAGU
UCAUCAAGCCGAUCCUGGAAAAGAUGGACGGA
ACAGAAGAACUGCUGGUCAAGCUGAACAGAGA
AGACCUGCUGAGAAAGCAGAGAACAUCGACA
ACGGAAGCAUCCCGCACCAGAUCACCUGGGA
GAACUGCACGCAAUCCUGAGAAGACAGGAAGA
CUUCUACCCGUUCCUGAAGGACAACAGAGAAA
AGAUCGAAAAGAUCUGACAUCAGAAUCCCG
UACUACGUCGGACCGCUGGCAAGAGGAAACAG
CAGAUUCGCAUGGAUGACAAGAAAGAGCGAAG
AAACAAUCACACCGUGGAACUUCGAAGAAGUC

GUCGACAAGGGAGCAAGCGCACAGAGCUUCAU
CGAAAGAAUGACAAACUUCGACAAGAACCUGC
CGAACGAAAAGGUCCUGCCGAAGCACAGCCUG
CUGUACGAAUACUUCACAGUCUACAACGAACU
GACAAAGGUCAAGUACGUCACAGAAGGAAUGA
GAAAGCCGGCAUUCCUGAGCGGAGAACAGAAG
AAGGCAAUCGUCGACCUGCUGUUCAAGACAAA
CAGAAAGGUCACAGUCAAGCAGCUGAAGGAAG
ACUACUUCAAGAAGAUCGAAUGCUUCGACAGC
GUCGAAAUCAGCGGAGUCGAAGACAGAUUCA
CGCAAGCCUGGGAACAUAACCACGACCUGCUGA
AGAUCAUCAAGGACAAGGACUUCCUGGACAAC
GAAGAAAACGAAGACAUCCUGGAAGACAUCGU
CCUGACACUGACACUGUUCGAAGACAGAGAAA
UGAUCGAAGAAAGACUGAAGACAUACGCACAC
CUGUUCGACGACAAGGUCAUGAAGCAGCUGAA
GAGAAGAAGAUACACAGGAUGGGGAAGACUG
AGCAGAAAGCUGAUCAACGGAAUCAGAGACAA
GCAGAGCGGAAAGACAAUCCUGGACUUCCUGA
AGAGCGACGGAUUCGCAAACAGAAACUUCAUG
CAGCUGAUCCACGACGACAGCCUGACAUUCAA
GGAAGACAUCCAGAAGGCACAGGUCAGCGGAC
AGGGAGACAGCCUGCACGAACACAUCGCAAAC
CUGGCAGGAAGCCCGGCAAUCAAGAAGGGAAU
CCUGCAGACAGUCAAGGUCGUCGACGAACUGG
UCAAGGUCAUGGGAAGACACAAGCCGGAAAAC
AUCGUCAUCGAAAUGGCAAGAGAAAACCAGAC
AACACAGAAGGGACAGAAGAACAGCAGAGAAA
GAAUGAAGAGAAUCGAAGAAGGAAUCAAGGA
ACUGGGAAGCCAGAUAUCCUGAAGGAACACCCGG
UCGAAAACACACAGCUGCAGAACGAAAAGCUG
UACCUGUACUACCUGCAGAACGGAAGAGACAU
GUACGUCGACCAGGAACUGGACAUCAACAGAC
UGAGCGACUACGACGUCGACGCAAUCGUCCG
CAGAGCUUCCUGAAGGACGACAGCAUCGACAA

CAAGGUCCUGACAAGAAGCGACAAGAACAGAG
GAAAGAGCGACAACGUCCCGAGCGAAGAAGUC
GUCAAGAAGAUGAAGAACUACUGGAGACAGCU
GCUGAACGCAAAGCUGAUCACACAGAGAAAGU
UCGACAACCUGACAAAGGCAGAGAGAGGAGGA
CUGAGCGAACUGGACAAGGCAGGAUUCAUCAA
GAGACAGCUGGUCGAAACAAGACAGAUCACAA
AGCACGUCGCACAGAUCUGGACAGCAGAAUG
AACACAAAGUACGACGAAAACGACAAGCUGAU
CAGAGAAGUCAAGGUCAUCACACUGAAGAGCA
AGCUGGUCAGCGACUUCAGAAAGGACUUCAG
UUCUACAAGGUCAGAGAAAUCAACAACUACCA
CCACGCACACGACGCAUACCUGAACGCAGUCG
UCGGAACAGCACUGAUCAAGAAGUACCCGAAG
CUGGAAAGCGAAUUCGUCUACGGAGACUACAA
GGUCUACGACGUCAGAAAGAUGAUCGCAAAGA
GCGAACAGGAAAUCGGAAAGGCAACAGCAAAG
UACUUCUUCUACAGCAACAUCAUGAACUUCU
CAAGACAGAAAUCACACUGGCAAACGGAGAAA
UCAGAAAGAGACCGCUGAUCGAAACAAACGGA
GAAACAGGAGAAAUCGUCUGGGACAAGGGAAG
AGACUUCGCAACAGUCAGAAAGGUCCUGAGCA
UGCCGCAGGUCAACAUCGUCAAGAAGACAGAA
GUCCAGACAGGAGGAUUCAGCAAGGAAAGCAU
CCUGCCGAAGAGAAACAGCGACAAGCUGAUCG
CAAGAAAGAAGGACUGGGACCCGAAGAAGUAC
GGAGGAUUCGACAGCCCGACAGUCGCAUACAG
CGUCCUGGUCGUCGCAAAGGUCGAAAAGGGAA
AGAGCAAGAAGCUGAAGAGCGUCAAGGAACUG
CUGGGAAUCACAAUCAUGGAAAGAAGCAGCUU
CGAAAAGAACCCGAUCGACUUCUGGAAGCAA
AGGGAUACAAGGAAGUCAAGAAGGACCUGAUC
AUCAAGCUGCCGAAGUACAGCCUGUUCGAACU
GGAAAACGGAAGAAAGAGAAUGCUGGCAAGCG
CAGGAGAACUGCAGAAGGGAAACGAACUGGCA

		CUGCCGAGCAAGUACGUCAACUUCCUGUACCU GGCAAGCCACUACGAAAAGCUGAAGGGAAGCC CGGAAGACAACGAACAGAAGCAGCUGUUCGUC GAACAGCACAAAGCACUACCUGGACGAAAUCAU CGAACAGAUCAGCGAAUUCAGCAAGAGAGUCA UCCUGGCAGACGCAAACCUGGACAAGGUCCUG AGCGCAUACAACAAGCACAGAGACAAGCCGAU CAGAGAACAGGCAGAAAACAUCAUCCACCUGU UCACACUGACAAACCUGGGAGCACCGGCAGCA UUCAAGUACUUCGACACAACAUCGACAGAAA GAGAUACACAAGCACAAAGGAAGUCCUGGACG CAACACUGAUCCACCAGAGCAUCACAGGACUG UACGAAACAAGAAUCGACCUGAGCCAGCUGGG AGGAGACGGAAGCGGAAGCCCGAAGAAGAAGA GAAAGGUCGACGGAAGCCCGAAGAAGAAGAGA AAGGUCGACAGCGGA	
Промотор T7		TAATACGACTCACTATA	231
Бета-глобин человека	5' UTR	ACATTTGCTTCTGACACAACCTGTGTTCCTAGCA ACCTCAAACAGACACC	232
Бета-глобин человека	3' UTR	GCTCGCTTTCTTGCTGTCCAATTTCTATTAAGG TTCCTTTGTTCCCTAAGTCCAACCTACTAACTGG GGGATATTATGAAGGGCCTTGAGCATCTGGATT CTGCCTAATAAAAAACATTTATTTTCATTGC	233
Альфа-глобин человека	5'UTR	CATAAACCCCTGGCGCGCTCGCGGCCCGGCACTC TTCTGGTCCCCACAGACTCAGAGAGAACCCACC	234
Альфа-глобин человека	3'UTR	GCTGGAGCCTCGGTGGCCATGCTTCTTGCCCCTT GGGCTCCCCCAGCCCCTCCTCCCCCTTCTGCA CCCGTACCCCGTGGTCTTTGAATAAAGTCTGA GTGGGCGGC	235
Бета глобин Xenopus laevis	5' UTR	AAGCTCAGAATAAACGCTCAACTTTGGCC	236
Бета глобин Xenopus laevis	3' UTR	ACCAGCCTCAAGAACACCCGAATGGAGTCTCTA AGCTACATAATAACCACTTACACTTTACAAAAT GTTGTCCCCCAAATGTAGCCATTCGTATCTGCT CCTAATAAAAAGAAAGTTTCTTCACATTCT	237

Бычий гормон роста 5' UTR	CAGGGTCCTGTGGACAGCTCACCAGCT	238
Бычий гормон роста 3' UTR	TTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCCTCCCCCGTG CCTTCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCCTG TCCTTTCCCTAATAAAATGAGGAAATTGCATCGC A	239
Мышиный гемоглобин альфа, зрелая цепь 1 (Hba-al), 3' UTR	GCTGCCTTCTGCGGGGCTTGCCTTCTGGCCATGC CCTTCTTCTCTCCCTTGCACCTGTACCTCTTGGTC TTTGAATAAAGCCTGAGTAGGAAG	240
HSD17B4 5' UTR	TCCCGCAGTCGGCGTCCAGCGGCTCTGCTTGTTT GTGTGTGTGTCGTTGCAGGCCTTATTC	241
G282 одноцепочечной РНК гида, таргетной к мышинному TTR гену	mU*mU*mA*CAGCCACGUCUACAGCAGUUUUA GAmGmCmUmAmGmAmAmUmAmGmCAAGU UAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUm UmGmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCm GmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	242
	Не используется	243
Транскрипт Cas 9 с 5' UTR к HSD, ORF соответствующего SEQ ID №: 204, и 3' UTR к ALB	GGGTCCCGCAGTCGGCGTCCAGCGGCTCTGCTT GTTCGTGTGTGTGTCGTTGCAGGCCTTATTCGGA TCCATGGACAAGAAGTACAGCATCGGACTGGAC ATCGGAACAACAGCGTCGGATGGGCAGTCATC ACAGACGAATACAAGGTCCCGAGCAAGAAGTT CAAGGTCCTGGGAAACACAGACAGACACAGCA TCAAGAAGAACCTGATCGGAGCACTGCTGTTCG ACAGCGGAGAAACAGCAGAAGCAACAAGACTG AAGAGAACAGCAAGAAGAAGATACACAAGAAG AAAGAACAGAATCTGCTACCTGCAGGAAATCTT CAGCAACGAAATGGCAAAGGTCGACGACAGCT TCTTCCACAGACTGGAAGAAAGCTTCTGGTTCG AAGAAGACAAGAAGCACGAAAGACACCCGATC TTCGGAAACATCGTCGACGAAGTCGCATACCAC GAAAAGTACCCGACAATCTACCACCTGAGAAAG AAGCTGGTCGACAGCACAGACAAGGCAGACCT GAGACTGATCTACCTGGCACTGGCACACATGAT CAAGTTCAGAGGACACTTCTGATCGAAGGAGA	244

CCTGAACCCGGACAACAGCGACGTCGACAAGCT
GTTTCATCCAGCTGGTCCAGACATAACAACCAGCT
GTTTCGAAGAAAACCCGATCAACGCAAGCGGAG
TCGACGCAAAGGCAATCCTGAGCGCAAGACTGA
GCAAGAGCAGAAGACTGGAAAACCTGATCGCA
CAGCTGCCGGGAGAAAAGAAGAACGGACTGTT
CGGAAACCTGATCGCACTGAGCCTGGGACTGAC
ACCGAACTTCAAGAGCAACTTCGACCTGGCAGA
AGACGCAAAGCTGCAGCTGAGCAAGGACACAT
ACGACGACGACCTGGACAACCTGCTGGCACAGA
TCGGAGACCAGTACGCAGACCTGTTCTGGCAG
CAAAGAACCTGAGCGACGCAATCCTGCTGAGCG
ACATCCTGAGAGTCAACACAGAAATCACAAAG
GCACCGCTGAGCGCAAGCATGATCAAGAGATAC
GACGAACACCACCAGGACCTGACACTGCTGAAG
GCACTGGTCAGACAGCAGCTGCCGGAAAAGTAC
AAGGAAATCTTCTTCGACCAGAGCAAGAACGGA
TACGCAGGATACATCGACGGAGGAGCAAGCCA
GGAAGAATTCTACAAGTTCATCAAGCCGATCCT
GGAAAAGATGGACGGAACAGAAGAACTGCTGG
TCAAGCTGAACAGAGAAGACCTGCTGAGAAAG
CAGAGAACATTCGACAACGGAAGCATCCCGCAC
CAGATCCACCTGGGAGAACTGCACGCAATCCTG
AGAAGACAGGAAGACTTCTACCCGTTCTGAAG
GACAACAGAGAAAAGATCGAAAAGATCCTGAC
ATTCAGAATCCCGTACTACGTCGGACCGCTGGC
AAGAGGAAACAGCAGATTCGCATGGATGACAA
GAAAGAGCGAAGAAACAATCACACCGTGGAAC
TTCGAAGAAGTCGTCGACAAGGGAGCAAGCGC
ACAGAGCTTCATCGAAAGAATGACAAACTTCGA
CAAGAACCTGCCGAACGAAAAGGTCCTGCCGA
AGCACAGCCTGCTGTACGAATACTTCACAGTCT
ACAACGAACTGACAAAGGTCAAGTACGTCACA
GAAGGAATGAGAAAGCCGGCATTCTGAGCGG
AGAACAGAAGAAGGCAATCGTCGACCTGCTGTT

CAAGACAAACAGAAAGGTCACAGTCAAGCAGC
TGAAGGAAGACTACTTCAAGAAGATCGAATGCT
TCGACAGCGTCGAAATCAGCGGAGTCGAAGAC
AGATTCAACGCAAGCCTGGGAACATAACCACGAC
CTGCTGAAGATCATCAAGGACAAGGACTTCCTG
GACAACGAAGAAAACGAAGACATCCTGGAAGA
CATCGTCCTGACACTGACACTGTTCGAAGACAG
AGAAATGATCGAAGAAAGACTGAAGACATACG
CACACCTGTTCGACGACAAGGTCATGAAGCAGC
TGAAGAGAAGAAGATACACAGGATGGGGAAGA
CTGAGCAGAAAGCTGATCAACGGAATCAGAGA
CAAGCAGAGCGGAAAGACAATCCTGGACTTCCT
GAAGAGCGACGGATTCGCAAACAGAACTTCAT
GCAGCTGATCCACGACGACAGCCTGACATTCAA
GGAAGACATCCAGAAGGCACAGGTCAGCGGAC
AGGGAGACAGCCTGCACGAACACATCGCAAAC
CTGGCAGGAAGCCCGGCAATCAAGAAGGGAAT
CCTGCAGACAGTCAAGGTCGTCGACGAACTGGT
CAAGGTCATGGGAAGACACAAGCCGGAAAACA
TCGTCATCGAAATGGCAAGAGAAAACCAGACA
ACACAGAAGGGACAGAAGAACAGCAGAGAAAG
AATGAAGAGAATCGAAGAAGGAATCAAGGAAC
TGGGAAGCCAGATCCTGAAGGAACACCCGGTCG
AAAACACACAGCTGCAGAACGAAAAGCTGTAC
CTGTACTACCTGCAGAACGGAAGAGACATGTAC
GTCGACCAGGAACTGGACATCAACAGACTGAGC
GACTACGACGTCGACCACATCGTCCCGCAGAGC
TTCCTGAAGGACGACAGCATCGACAACAAGGTC
CTGACAAGAAGCGACAAGAACAGAGGAAAGAG
CGACAACGTCCCGAGCGAAGAAGTCGTCAAGA
AGATGAAGAACTACTGGAGACAGCTGCTGAAC
GCAAAGCTGATCACACAGAGAAAGTTCGACAA
CCTGACAAAGGCAGAGAGAGGAGGACTGAGCG
AACTGGACAAGGCAGGATTCATCAAGAGACAG
CTGGTCGAAACAAGACAGATCACAAGCACGTC

GCACAGATCCTGGACAGCAGAATGAACACAAA
GTACGACGAAAACGACAAGCTGATCAGAGAAG
TCAAGGTCATCACACTGAAGAGCAAGCTGGTCA
GCGACTTCAGAAAGGACTTCCAGTTCTACAAGG
TCAGAGAAATCAACA ACTACCACCACGCACACG
ACGCATACCTGAACGCAGTCGTCGGAACAGCAC
TGATCAAGAAGTACCCGAAGCTGGAAAGCGAA
TTCGTCTACGGAGACTACAAGGTCTACGACGTC
AGAAAGATGATCGCAAAGAGCGAACAGGAAAT
CGGAAAGGCAACAGCAAAGTACTTCTTCTACAG
CAACATCATGAACTTCTTCAAGACAGAAATCAC
ACTGGCAAACGGAGAAATCAGAAAGAGACCGC
TGATCGAAACAAACGGAGAAACAGGAGAAATC
GTCTGGGACAAGGGAAGAGACTTCGCAACAGTC
AGAAAGGTCTGAGCATGCCGCAGGTCAACATC
GTCAAGAAGACAGAAGTCCAGACAGGAGGATT
CAGCAAGGAAAGCATCCTGCCGAAGAGAAACA
GCGACAAGCTGATCGCAAGAAAGAAGGACTGG
GACCCGAAGAAGTACGGAGGATTCGACAGCCC
GACAGTCGCATACAGCGTCCTGGTCGTCGCAA
GGTCGAAAAGGGAAAGAGCAAGAAGCTGAAGA
GCGTCAAGGAACTGCTGGGAATCACAATCATGG
AAAGAAGCAGCTTCGAAAAGAACCCGATCGAC
TTCCTGGAAGCAAAGGGATACAAGGAAGTCAA
GAAGGACCTGATCATCAAGCTGCCGAAGTACAG
CCTGTTCGAACTGGAAAACGGAAGAAAGAGAA
TGCTGGCAAGCGCAGGAGAACTGCAGAAGGGA
AACGAACTGGCACTGCCGAGCAAGTACGTCAAC
TTCCTGTACCTGGCAAGCCACTACGAAAAGCTG
AAGGGAAGCCCGGAAGACAACGAACAGAAGCA
GCTGTTCGTCGAACAGCACAAGCACTACCTGGA
CGAAATCATCGAACAGATCAGCGAATTCAGCAA
GAGAGTCATCCTGGCAGACGCAAACCTGGACAA
GGTCCTGAGCGCATAACAAGCACAGAGACA
AGCCGATCAGAGAACAGGCAGAAAACATCATC

	<p>CACCTGTTCACTGACAAACCTGGGAGCACCG GCAGCATTCAAGTACTTCGACACAACAATCGAC AGAAAGAGATACACAAGCACAAAGGAAGTCCT GGACGCAACACTGATCCACCAGAGCATCACAGG ACTGTACGAAACAAGAATCGACCTGAGCCAGCT GGGAGGAGACGGAGGAGGAAGCCCGAAGAAGA AGAGAAAGGTCTAGCTAGCCATCACATTTAAAA GCATCTCAGCCTACCATGAGAATAAGAGAAAGA AAATGAAGATCAATAGCTTATTCATCTCTTTTC TTTTTCGTTGGTGTAAAGCCAACACCCTGTCTAA AAAACATAAATTTCTTTAATCATTTTGCCTCTTT TCTCTGTGCTTCAATTAATAAAAAATGGAAAGA ACCTCGAG</p>	
<p>ORF для альтернативной Cas 9 с содержанием U 19,36%</p>	<p>ATGGATAAGAAGTACTCGATCGGGCTGGATATC GGAACTAATTCCGTGGGTTGGGCAGTGATCACG GATGAATACAAAGTGCCGTCCAAGAAGTTCAAG GTCCTGGGGAACACCGATAGACACAGCATCAAG AAGAATCTCATCGGAGCCCTGCTGTTTGACTCC GGCGAAACCGCAGAAGCGACCCGGCTCAAACG TACCGCGAGGCGACGCTACACCCGGCGGAAGA ATCGCATCTGCTATCTGCAAGAAATCTTTTCGAA CGAAATGGCAAAGGTGGACGACAGCTTCTTCCA CCGCCTGGAAGAATCTTTCCTGGTGGAGGAGGA CAAGAAGCATGAACGGCATCCTATCTTTGGAAA CATCGTGGACGAAGTGGCGTACCACGAAAAGTA CCCGACCATCTACCATCTGCGGAAGAAGTTGGT TGACTCAACTGACAAGGCCGACCTCAGATTGAT CTACTTGGCCCTCGCCATATGATCAAATCCGC GGACACTTCCTGATCGAAGGCGATCTGAACCCT GATAACTCCGACGTGGATAAGCTGTTCATTCAA CTGGTGCAGACCTACAACCAACTGTTCGAAGAA AACCCAATCAATGCCAGCGGCGTCGATGCCAAG GCCATCCTGTCCGCCCGGCTGTGCAAGTCGCGG CGCCTCGAAAACCTGATCGCACAGCTGCCGGGA GAGAAGAAGAACGGACTTTTCGGCAACTTGATC</p>	<p>245</p>

GCTCTCTCACTGGGACTCACTCCCAATTTCAAGT
CCAATTTTGACCTGGCCGAGGACGCGAAGCTGC
AACTCTCAAAGGACACCTACGACGACGACTTGG
ACAATTTGCTGGCACAAATTGGCGATCAGTACG
CGGATCTGTTCTTGCCGCTAAGAACCTTTCGGA
CGCAATCTTGCTGTCCGATATCCTGCGCGTGAA
CACCGAAATAACCAAAGCGCCGCTTAGCGCCTC
GATGATTAAGCGGTACGACGAGCATCACCAGGA
TCTCACGCTGCTCAAAGCGCTCGTGAGACAGCA
ACTGCCTGAAAAGTACAAGGAGATTTTCTTCGA
CCAGTCCAAGAATGGGTACGCAGGGTACATCGA
TGGAGGCGCCAGCCAGGAAGAGTTCTATAAGTT
CATCAAGCCAATCCTGGAAAAGATGGACGGAA
CCGAAGAAGTCTGGTCAAGCTGAACAGGGAG
GATCTGCTCCGCAAACAGAGAACCTTTGACAAC
GGAAGCATTCCACACCAGATCCATCTGGGTGAG
CTGCACGCCATCTTGCGGCGCCAGGAGGACTTT
TACCCATTCTCAAGGACAACCGGGAAAAGATC
GAGAAAATTCTGACGTTCCGCATCCCGTATTAC
GTGGGCCCACTGGCGCGCGCAATTCGCGCTTC
GCGTGGATGACTAGAAAATCAGAGGAAACCAT
CACTCCTTGGAATTTTCGAGGAAGTTGTGGATAA
GGGAGCTTCGGCACAATCCTTCATCGAACGAAT
GACCAACTTCGACAAGAATCTCCCAAACGAGAA
GGTGCTTCCTAAGCACAGCCTCCTTTACGAATA
CTTCACTGTCTACAACGAACTGACTAAAGTGAA
ATACGTTACTGAAGGAATGAGGAAGCCGGCCTT
TCTGAGCGGAGAACAGAAGAAAGCGATTGTCTG
ATCTGCTGTTCAAGACCAACCGCAAGGTGACCG
TCAAGCAGCTTAAAGAGGACTACTTCAAGAAGA
TCGAGTGTTTCGACTCAGTGGAAATCAGCGGAG
TGGAGGACAGATTCAACGCTTCGCTGGGAACCT
ATCATGATCTCCTGAAGATCATCAAGGACAAGG
ACTTCCTTGACAACGAGGAGAACGAGGACATCC
TGGAAGATATCGTCCTGACCTTGACCCTTTTCGA

GGATCGCGAGATGATCGAGGAGAGGCTTAAGA
CCTACGCTCATCTCTTCGACGATAAGGTCATGA
AACAACTCAAGCGCCGCGGTACACTGGTTGGG
GCCGCCTCTCCGCAAGCTGATCAACGGTATTC
GCGATAAACAGAGCGGTAAAACCTATCCTGGATT
TCCTCAAATCGGATGGCTTCGCTAATCGTAACTT
CATGCAGTTGATCCACGACGACAGCCTGACCTT
TAAGGAGGACATCCAGAAAGCACAAAGTGAGCG
GACAGGGAGACTCACTCCATGAACACATCGCGA
ATCTGGCCGGTTCGCCGGCGATTAAGAAGGGAA
TCCTGCAAACCTGTGAAGGTGGTGGACGAGCTGG
TGAAGGTCATGGGACGGCACAAACCGGAGAAT
ATCGTGATTGAAATGGCCCGAGAAAACCAGACT
ACCCAGAAGGGCCAGAAGAACTCCCGCGAAAG
GATGAAGCGGATCGAAGAAGGAATCAAGGAGC
TGGGCAGCCAGATCCTGAAAGAGCACCCGGTGG
AAAACACGCAGCTGCAGAACGAGAAGCTCTAC
CTGTACTATTTGCAAATGGACGGGACATGTAC
GTGGACCAAGAGCTGGACATCAATCGGTTGTCT
GATTACGACGTGGACCACATCGTTCCACAGTCC
TTTCTGAAGGATGACTCCATCGATAACAAGGTG
TTGACTCGCAGCGACAAGAACAGAGGGGAAGTC
AGATAATGTGCCATCGGAGGAGGTCGTGAAGA
AGATGAAGAATTACTGGCGGCAGCTCCTGAATG
CGAAGCTGATTACCCAGAGAAAGTTTGACAATC
TCACTAAAGCCGAGCGCGGGCGGACTCTCAGAGC
TGGATAAGGCTGGATTCATCAAACGGCAGCTGG
TCGAGACTCGGCAGATTACCAAGCACGTGGCGC
AGATCCTGGACTCCCGCATGAACACTAAATACG
ACGAGAACGATAAGCTCATCCGGGAAGTGAAG
GTGATTACCCTGAAAAGCAAACCTTGTGTCGGAC
TTTCGGAAGGACTTTTCAGTTTTTACAAAGTGAGA
GAAATCAACAACCTACCATCACGCGCATGACGCA
TACCTCAACGCTGTGGTTCGGCACCGCCCTGATC
AAGAAGTACCCTAAACTTGAATCGGAGTTTGTG

TACGGAGACTACAAGGTCTACGACGTGAGGAA
GATGATAGCCAAGTCCGAACAGGAAATCGGGA
AAGCAACTGCGAAATACTTCTTTTACTCAAACA
TCATGAACTTCTTCAAGACTGAAATTACGCTGG
CCAATGGAGAAATCAGGAAGAGGCCACTGATC
GAAACTAACGGAGAAACGGGCGAAATCGTGTG
GGACAAGGGCAGGGACTTCGCAACTGTTGCAA
AGTGCTCTCTATGCCGCAAGTCAATATTGTGAA
GAAAACCGAAGTGCAAACCGGCGGATTTTCAA
GGAATCGATCCTCCCAAAGAGAAATAGCGACA
AGCTCATTGCACGCAAGAAAGACTGGGACCCGA
AGAAGTACGGAGGATTCGATTCGCCGACTGTGCG
CATACTCCGTCTCTCGTGGTGGCCAAGGTGGAGA
AGGGAAAGAGCAAGAAGCTCAAATCCGTCAA
GAGCTGCTGGGGATTACCATCATGGAACGATCC
TCGTTGAGAAGAACCCGATTGATTTCTGGAG
GCGAAGGGTTACAAGGAGGTGAAGAAGGATCT
GATCATCAAACCTGCCAAGTACTCACTGTTGCA
ACTGGAAAATGGTCGGAAGCGCATGCTGGCTTC
GGCCGGAGAACTCCAGAAAGGAAATGAGCTGG
CCTTGCCCTAGCAAGTACGTCAACTTCCTCTATCT
TGCTTCGCACTACGAGAACTCAAAGGGTCACC
GGAAGATAACGAACAGAAGCAGCTTTTCGTGGA
GCAGCACAAGCATTATCTGGATGAAATCATCGA
ACAAATCTCCGAGTTTTCAAAGCGCGTGATCCT
CGCCGACGCCAACCTCGACAAAGTCCTGTCGGC
CTACAATAAGCATAGAGATAAGCCGATCAGAG
AACAGGCCGAGAACATTATCCACTTGTTCACCC
TGACTAACCTGGGAGCTCCAGCCGCCTTCAAGT
ACTTCGATACTACTATCGACCGCAAAGATAACA
CGTCCACCAAGGAAGTTCTGGACGCGACCCTGA
TCCACCAAAGCATCACTGGACTCTACGAAACTA
GGATCGATCTGTGCGAGCTGGGTGGCGATGGTG
GCGGTGGATCCTACCCATACGACGTGCCTGACT
ACGCCTCCGGAGGTGGTGGCCCCAAGAAGAAA

	CGGAAGGTGTGATAG	
Транскрипт Cas 9 с 5' UTR к HSD, ORF соответствующей SEQ ID №: 245, последовательность Kozak и 3' UTR к ALB	GGGTCCCGCAGTCGGCGTCCAGCGGCTCTGCTT GTTCGTGTGTGTGTCGTTGCAGGCCTTATTCGGA TCTGCCACCATGGATAAGAAGTACTCGATCGGG CTGGATATCGGAACTAATTCCGTGGGTTGGGCA GTGATCACGGATGAATACAAAGTGCCGTCCAAG AAGTTCAAGGTCCTGGGGAACACCGATAGACAC AGCATCAAGAAGAATCTCATCGGAGCCCTGCTG TTTACTCCGGCGAAACCGCAGAAGCGACCCGG CTCAAACGTACCGCGAGGCGACGCTACACCCGG CGGAAGAATCGCATCTGCTATCTGCAAGAAATC TTTTCGAACGAAATGGCAAAGGTGGACGACAGC TTCTTCCACCGCCTGGAAGAATCTTTCCTGGTGG AGGAGGACAAGAAGCATGAACGGCATCCTATCT TTGGAAACATCGTGGACGAAGTGGCGTACCACG AAAAGTACCCGACCATCTACCATCTGCGGAAGA AGTTGGTTGACTCAACTGACAAGGCCGACCTCA GATTGATCTACTTGGCCCTCGCCATATGATCAA ATTCCGCGGACACTTCCTGATCGAAGGCGATCT GAACCCTGATAACTCCGACGTGGATAAGCTGTT CATTCAACTGGTGCAGACCTACAACCAACTGTT CGAAGAAAACCCAATCAATGCCAGCGGCGTCG ATGCCAAGGCCATCCTGTCCGCCCGGCTGTCGA AGTCGCGGCGCCTCGAAAACCTGATCGCACAGC TGCCGGGAGAGAAGAAGAACGGACTTTTCGGC AACTTGATCGCTCTCTCACTGGGACTCACTCCCA ATTTCAAGTCCAATTTTGACCTGGCCGAGGACG CGAAGCTGCAACTCTCAAAGGACACCTACGACG ACGACTTGGACAATTTGCTGGCACAATTTGGCG ATCAGTACGCGGATCTGTTCCCTTGCCGCTAAGA ACCTTTCGGACGCAATCTTGCTGTCCGATATCCT GCGCGTGAACACCGAAATAACCAAAGCGCCGCT TAGCGCCTCGATGATTAAGCGGTACGACGAGCA TCACCAGGATCTCACGCTGCTCAAAGCGCTCGT GAGACAGCAACTGCCTGAAAAGTACAAGGAGA	246

TTTTCTTCGACCAGTCCAAGAATGGGTACGCAG
GGTACATCGATGGAGGCGCCAGCCAGGAAGAG
TTCTATAAGTTCATCAAGCCAATCCTGGAAAAG
ATGGACGGAACCGAAGAAGTCTGGTCAAGCTG
AACAGGGAGGATCTGCTCCGCAAACAGAGAAC
CTTTGACAACGGAAGCATTCCACACCAGATCCA
TCTGGGTGAGCTGCACGCCATCTTGCGGCGCCA
GGAGGACTTTTACCCATTCCTCAAGGACAACCG
GGAAAAGATCGAGAAAATTCTGACGTTCCGCAT
CCCGTATTACGTGGGCCCACTGGCGCGCGGCAA
TTCGCGCTTCGCGTGGATGACTAGAAAATCAGA
GGAAACCATCACTCCTTGGAATTCGAGGAAGT
TGTGGATAAGGGAGCTTCGGCACAATCCTTCAT
CGAACGAATGACCAACTTCGACAAGAATCTCCC
AAACGAGAAGGTGCTTCCTAAGCACAGCCTCCT
TTACGAATACTTCACTGTCTACAACGAACTGAC
TAAAGTGAAATACGTTACTGAAGGAATGAGGA
AGCCGGCCTTTCTGAGCGGAGAACAGAAGAAA
GCGATTGTCGATCTGCTGTTCAAGACCAACCGC
AAGGTGACCGTCAAGCAGCTTAAAGAGGACTAC
TTCAAGAAGATCGAGTGTTTCGACTCAGTGGAA
ATCAGCGGAGTGGAGGACAGATTCAACGCTTCG
CTGGGAACCTATCATGATCTCCTGAAGATCATC
AAGGACAAGGACTTCCTTGACAACGAGGAGAA
CGAGGACATCCTGGAAGATATCGTCCTGACCTT
GACCCTTTTCGAGGATCGCGAGATGATCGAGGA
GAGGCTTAAGACCTACGCTCATCTCTTCGACGA
TAAGGTCATGAAACAACCTCAAGCGCCGCCGTA
CACTGGTTGGGGCCGCCTCTCCCGCAAGCTGAT
CAACGGTATTCGCGATAAACAGAGCGGTAAAAC
TATCCTGGATTTCTCAAATCGGATGGCTTCGCT
AATCGTAACTTCATGCAGTTGATCCACGACGAC
AGCCTGACCTTTAAGGAGGACATCCAGAAAGCA
CAAGTGAGCGGACAGGGAGACTCACTCCATGA
ACACATCGCGAATCTGGCCGGTTCGCCGGCGAT

TAAGAAGGGAATCCTGCAAACCTGTGAAGGTGGT
GGACGAGCTGGTGAAGGTCATGGGACGGCACA
AACCGGAGAATATCGTGATTGAAATGGCCCGAG
AAAACCAGACTACCCAGAAGGGCCAGAAGAAC
TCCCGCGAAAGGATGAAGCGGATCGAAGAAGG
AATCAAGGAGCTGGGCAGCCAGATCCTGAAAG
AGCACCCGGTGGAAAACACGCAGCTGCAGAAC
GAGAAGCTCTACCTGTACTATTTGCAAATGGA
CGGGACATGTACGTGGACCAAGAGCTGGACATC
AATCGGTTGTCTGATTACGACGTGGACCACATC
GTTCCACAGTCCTTTCTGAAGGATGACTCCATCG
ATAACAAGGTGTTGACTCGCAGCGACAAGAACA
GAGGGAAGTCAGATAATGTGCCATCGGAGGAG
GTCGTGAAGAAGATGAAGAATTACTGGCGGCA
GCTCCTGAATGCGAAGCTGATTACCCAGAGAAA
GTTTGACAATCTCACTAAAGCCGAGCGCGGCGG
ACTCTCAGAGCTGGATAAGGCTGGATTCATCAA
ACGGCAGCTGGTCGAGACTCGGCAGATTACCAA
GCACGTGGCGCAGATCCTGGACTCCCGCATGAA
CACTAAATACGACGAGAACGATAAGCTCATCCG
GGAAGTGAAGGTGATTACCCTGAAAAGCAAAC
TGTGTCGGACTTTCGGAAGGACTTTCAGTTTTAC
AAAGTGAGAGAAATCAACAACCTACCATCACGC
GCATGACGCATACCTCAACGCTGTGGTCGGCAC
CGCCCTGATCAAGAAGTACCCTAAACTTGAATC
GGAGTTTGTGTACGGAGACTACAAGGTCTACGA
CGTGAGGAAGATGATAGCCAAGTCCGAACAGG
AAATCGGGAAAGCAAACCTGCGAAATACTTCTTTT
ACTCAAACATCATGAACTTCTTCAAGACTGAAA
TTACGCTGGCCAATGGAGAAATCAGGAAGAGG
CCACTGATCGAAACTAACGGAGAAACGGGCGA
AATCGTGTGGGACAAGGGCAGGGACTTCGCAAC
TGTTGCGAAAGTGCTCTCTATGCCGCAAGTCAA
TATTGTGAAGAAAACCGAAGTGCAAACCGGCG
GATTTTCAAAGGAATCGATCCTCCCAAAGAGAA

	<p> ATAGCGACAAGCTCATTGCACGCAAGAAAGACT GGGACCCGAAGAAGTACGGAGGATTCGATTCGC CGACTGTTCGATACTCCGTCCTCGTGGTGGCCA AGGTGGAGAAGGGAAAGAGCAAGAAGCTCAA TCCGTCAAAGAGCTGCTGGGGATTACCATCATG GAACGATCCTCGTTCGAGAAGAACCCGATTGAT TTCCTGGAGGCGAAGGGTTACAAGGAGGTGAA GAAGGATCTGATCATCAAAGTCCCAAGTACTC ACTGTTTGAAGTGGAAAATGGTCGGAAGCGCAT GCTGGCTTCGGCCGGAGAACTCCAGAAAGGAA ATGAGCTGGCCTTGCCTAGCAAGTACGTCAACT TCCTCTATCTTGCTTCGCACTACGAGAACTCAA AGGGTCACCGGAAGATAACGAACAGAAGCAGC TTTTCGTGGAGCAGCACAAAGCATTATCTGGATG AAATCATCGAACAATCTCCGAGTTTTCAAAGC GCGTGATCCTCGCCGACGCCAACCTCGACAAAG TCCTGTTCGGCCTACAATAAGCATAGAGATAAGC CGATCAGAGAACAGGCCGAGAACATTATCCACT TGTTACCCCTGACTAACCTGGGAGCTCCAGCCG CCTTCAAGTACTTCGATACTACTATCGACCGCA AAAGATACACGTCCACCAAGGAAGTTCTGGACG CGACCCTGATCCACCAAAGCATCACTGGACTCT ACGAAACTAGGATCGATCTGTTCGCAGCTGGGTG GCGATGGTGGCGGTGGATCCTACCCATACGACG TGCCTGACTACGCTCCGGAGGTGGTGGCCCA AGAAGAAACGGAAGGTGTGATAGCTAGCCATC ACATTTAAAAGCATCTCAGCCTACCATGAGAAT AAGAGAAAGAAAATGAAGATCAATAGCTTATTC ATCTCTTTTTCTTTTTTCGTTGGTGTAAAGCCAAC ACCCTGTCTAAAAACATAAATTTCTTTAATCAT TTTGCCTCTTTTCTCTGTGCTTCAATTAATAAAA AATGGAAAGAACCTCGAG </p>	
<p> Транскрипт Cas 9 с 5' UTR к HSD, ORF соответствующей SEQ </p>	<p> GGGTCCCGCAGTCGGCGTCCAGCGGCTCTGCTT GTTCGTGTGTGTGTCGTTGCAGGCCTTATTCGGA TCTATGGATAAGAAGTACTCGATCGGGCTGGAT </p>	247

ID №: 245, и 3' UTR к
ALB

ATCGGAACTAATTCCGTGGGTTGGGCAGTGATC
ACGGATGAATACAAAGTGCCGTCCAAGAAGTTC
AAGGTCCTGGGGAACACCGATAGACACAGCATC
AAGAAGAATCTCATCGGAGCCCTGCTGTTTGAC
TCCGGCGAAACCGCAGAAGCGACCCGGCTCAA
ACGTACCGCGAGGCGACGCTACACCCGGCGGA
AGAATCGCATCTGCTATCTGCAAGAAATCTTTTC
GAACGAAATGGCAAAGGTGGACGACAGCTTCTT
CCACCGCCTGGAAGAATCTTTCCTGGTGGAGGA
GGACAAGAAGCATGAACGGCATCCTATCTTTGG
AAACATCGTGGACGAAGTGGCGTACCACGAAA
AGTACCCGACCATCTACCATCTGCGGAAGAAGT
TGGTTGACTCAACTGACAAGGCCGACCTCAGAT
TGATCTACTTGGCCCTCGCCATATGATCAAATT
CCGCGGACACTTCCTGATCGAAGGCGATCTGAA
CCCTGATAACTCCGACGTGGATAAGCTGTTCAT
TCAACTGGTGCAGACCTACAACCAACTGTTCGA
AGAAAACCCAATCAATGCCAGCGGCGTCGATGC
CAAGGCCATCCTGTCCGCCC GGCTGT CGAAGTC
GCGGCGCCTCGAAAACCTGATCGCACAGCTGCC
GGGAGAGAAGAAGAACGGACTTTTCGGCAACTT
GATCGCTCTCTCACTGGGACTCACTCCCAATTC
AAGTCCAATTTTGACCTGGCCGAGGACGCGAAG
CTGCAACTCTCAAAGGACACCTACGACGACGAC
TTGGACAATTTGCTGGCACA AATTGGCGATCAG
TACGCGGATCTGTTCCCTTGCCGCTAAGAACCTTT
CGGACGCAATCTTGCTGTCCGATATCCTGCGCG
TGAACACCGAAATAACCAAAGCGCCGCTTAGCG
CCTCGATGATTAAGCGGTACGACGAGCATCACC
AGGATCTCACGCTGCTCAAAGCGCTCGTGAGAC
AGCAACTGCCTGAAAAGTACAAGGAGATTTTCT
TCGACCAGTCCAAGAATGGGTACGCAGGGTACA
TCGATGGAGGCCAGCCAGGAAGAGTTCTATA
AGTTCATCAAGCCAATCCTGGAAAAGATGGACG
GAACCGAAGAACTGCTGGTCAAGCTGAACAGG

GAGGATCTGCTCCGCAAACAGAGAACCTTTGAC
AACGGAAGCATTCCACACCAGATCCATCTGGGT
GAGCTGCACGCCATCTTGCGGCGCCAGGAGGAC
TTTTACCCATTCTCAAGGACAACCGGGAAAAG
ATCGAGAAAATTCTGACGTTCCGCATCCCGTAT
TACGTGGGCCCACTGGCGCGCGGCAATTCGCGC
TTCGCGTGGATGACTAGAAAATCAGAGGAAACC
ATCACTCCTTGAATTTTCGAGGAAGTTGTGGAT
AAGGGAGCTTCGGCACAATCCTTCATCGAACGA
ATGACCAACTTCGACAAGAATCTCCCAAACGAG
AAGGTGCTTCTAAGCACAGCCTCCTTTACGAA
TACTTCACTGTCTACAACGAACTGACTAAAGTG
AAATACGTTACTGAAGGAATGAGGAAGCCGGC
CTTTCTGAGCGGAGAACAGAAGAAAGCGATTGT
CGATCTGCTGTTCAAGACCAACCGCAAGGTGAC
CGTCAAGCAGCTTAAAGAGGACTACTTCAAGAA
GATCGAGTGTTTCGACTCAGTGGAAATCAGCGG
AGTGGAGGACAGATTCAACGCTTCGCTGGGAAC
CTATCATGATCTCCTGAAGATCATCAAGGACAA
GGACTTCCTTGACAACGAGGAGAACGAGGACAT
CCTGGAAGATATCGTCCTGACCTTGACCCTTTTC
GAGGATCGCGAGATGATCGAGGAGAGGCTTAA
GACCTACGCTCATCTCTTCGACGATAAGGTCAT
GAAACAACCTCAAGCGCCGCGGTACACTGGTTG
GGGCCGCTCTCCCGCAAGCTGATCAACGGTAT
TCGCGATAAACAGAGCGGTAAACTATCCTGGA
TTTCCTCAAATCGGATGGCTTCGCTAATCGTAAC
TTCATGCAGTTGATCCACGACGACAGCCTGACC
TTTAAGGAGGACATCCAGAAAGCACAAAGTGAG
CGGACAGGGAGACTCACTCCATGAACACATCGC
GAATCTGGCCGGTTCGCCGGCGATTAAGAAGGG
AATCCTGCAAACCTGTGAAGGTGGTGGACGAGCT
GGTGAAGGTCATGGGACGGCACAACCGGAGA
ATATCGTGATTGAAATGGCCCGAGAAAACCAGA
CTACCCAGAAGGGCCAGAAGAACTCCCGCGAA

AGGATGAAGCGGATCGAAGAAGGAATCAAGGA
GCTGGGCAGCCAGATCCTGAAAGAGCACCCGGT
GGAAAACACGCAGCTGCAGAACGAGAAGCTCT
ACCTGTACTATTTGCAAAATGGACGGGACATGT
ACGTGGACCAAGAGCTGGACATCAATCGGTTGT
CTGATTACGACGTGGACCACATCGTTCCACAGT
CCTTTCTGAAGGATGACTCCATCGATAACAAGG
TGTTGACTCGCAGCGACAAGAACAGAGGGAAG
TCAGATAATGTGCCATCGGAGGAGGTCGTGAAG
AAGATGAAGAATTACTGGCGGCAGCTCCTGAAT
GCGAAGCTGATTACCCAGAGAAAGTTTGACAAT
CTCACTAAAGCCGAGCGCGGGCGGACTCTCAGAG
CTGGATAAGGCTGGATTCATCAAACGGCAGCTG
GTCGAGACTCGGCAGATTACCAAGCACGTGGCG
CAGATCCTGGACTCCCGCATGAACACTAAATAC
GACGAGAACGATAAGCTCATCCGGGAAGTGAA
GGTGATTACCCTGAAAAGCAAACCTTGTGTCGGA
CTTTCGGAAGGACTTTCAGTTTTACAAAGTGAG
AGAAATCAACAACCTACCATCACGCGCATGACGC
ATACCTCAACGCTGTGGTCGGCACCGCCCTGAT
CAAGAAGTACCCTAAACTTGAATCGGAGTTTGT
GTACGGAGACTACAAGGTCTACGACGTGAGGA
AGATGATAGCCAAGTCCGAACAGGAAATCGGG
AAAGCAACTGCGAAATACTTCTTTTACTCAAAC
ATCATGAACTTCTTCAAGACTGAAATTACGCTG
GCCAATGGAGAAATCAGGAAGAGGCCACTGAT
CGAAACTAACGGAGAAACGGGCGAAATCGTGT
GGGACAAGGGCAGGGACTTCGCAACTGTTCGCA
AAGTGCTCTCTATGCCGCAAGTCAATATTGTGA
AGAAAACCGAAGTGCAAACCGGCGGATTTTCAA
AGGAATCGATCCTCCCAAAGAGAAATAGCGAC
AAGCTCATTGCACGCAAGAAAGACTGGGACCCG
AAGAAGTACGGAGGATTCGATTCGCCGACTGTC
GCATACTCCGTCCTCGTGGTGGCCAAGGTGGAG
AAGGGAAAGAGCAAGAAGCTCAAATCCGTCAA

	AGAGCTGCTGGGGATTACCATCATGGAACGATC CTCGTTGAGAGAAGAACCCGATTGATTTCTGGA GGCGAAGGGTTACAAGGAGGTGAAGAAGGATC TGATCATCAAAGTACCCCAAGTACTACTGTTTCG AACTGGAAAATGGTCGGAAGCGCATGCTGGCTT CGGCCGGAGAAGTCCAGAAAGGAAATGAGCTG GCCTTGCCTAGCAAGTACGTCAACTTCCTCTATC TTGCTTCGCACTACGAGAACTCAAAGGGTCAC CGGAAGATAACGAACAGAAGCAGCTTTTCGTGG AGCAGCACAAGCATTATCTGGATGAAATCATCG AACAAATCTCCGAGTTTTCAAAGCGCGTGATCC TCGCCGACGCCAACCTCGACAAAGTCCTGTCCG CCTACAATAAGCATAGAGATAAGCCGATCAGAG AACAGGCCGAGAACATTATCCACTTGTTCACCC TGACTAACCTGGGAGCTCCAGCCGCCTTCAAGT ACTTCGATACTACTATCGACCGCAAAGATACA CGTCCACCAAGGAAGTTCTGGACGCGACCCTGA TCCACCAAAGCATCACTGGACTCTACGAAACTA GGATCGATCTGTTCGACAGCTGGGTGGCGATGGTG GCGGTGGATCCTACCCATACGACGTGCCTGACT ACGCCCTCCGGAGGTGGTGGCCCAAGAAGAAA CGGAAGGTGTGATAGCTAGCCATCACATTTAAA AGCATCTCAGCCTACCATGAGAATAAGAGAAAG AAAATGAAGATCAATAGCTTATTCATCTCTTTTT CTTTTTTCGTTGGTGTAAAGCCAACACCCTGTCTA AAAAACATAAATTTCTTTAATCATTTTGCCTCTT TTCTCTGTGCTTCAATTAATAAAAAATGGAAAG AACCTCGAG	
	Не используется	248
Транскрипт Cas 9, включающий последовательность Kozak, с ORF Cas 9, использующей кодоны с высокой общей	GGGTCCCGCAGTCGGCGTCCAGCGGCTCTGCTT GTTTCGTGTGTGTGTCGTTGCAGGCCTTATTCGGA TCCGCCACCATGCCTAAGAAAAAGCGGAAGGTC GACGGGGATAAGAAGTACTCAATCGGGCTGGAT ATCGGAACATAATTCCGTGGGTTGGGCAGTGATC ACGGATGAATACAAAGTGCCGTCCAAGAAGTTC	249

экспрессией у человека

AAGGTCCTGGGGAACACCGATAGACACAGCATC
AAGAAAAATCTCATCGGAGCCCTGCTGTTTGAC
TCCGGCGAAACCGCAGAAGCGACCCGGCTCAA
ACGTACCGCGAGGCGACGCTACACCCGGCGGA
AGAATCGCATCTGCTATCTGCAAGAGATCTTTTC
GAACGAAATGGCAAAGGTCGACGACAGCTTCTT
CCACCGCCTGGAAGAATCTTTCCTGGTGGAGGA
GGACAAGAAGCATGAACGGCATCCTATCTTTGG
AAACATCGTCGACGAAGTGGCGTACCACGAAA
AGTACCCGACCATCTACCATCTGCGGAAGAAGT
TGGTTGACTCAACTGACAAGGCCGACCTCAGAT
TGATCTACTTGGCCCTCGCCATATGATCAAATT
CCGCGGACACTTCCTGATCGAAGGCGATCTGAA
CCCTGATAACTCCGACGTGGATAAGCTTTTCATT
CAACTGGTGCAGACCTACAACCAACTGTTTCGAA
GAAAACCAATCAATGCTAGCGGCGTCGATGCC
AAGGCCATCCTGTCCGCCCGGCTGTCGAAGTCG
CGGCGCCTCGAAAACCTGATCGCACAGCTGCCG
GGAGAGAAAAAGAACGGACTTTTCGGCAACTTG
ATCGCTCTCTCACTGGGACTCACTCCCAATTTCA
AGTCCAATTTTGACCTGGCCGAGGACGCGAAGC
TGCAACTCTCAAAGGACACCTACGACGACGACT
TGGACAATTTGCTGGCACAAATTGGCGATCAGT
ACGCGGATCTGTTTCCTTGCCGCTAAGAACCTTTC
GGACGCAATCTTGCTGTCCGATATCCTGCGCGT
GAACACCGAAATAACCAAAGCGCCGCTTAGCGC
CTCGATGATTAAGCGGTACGACGAGCATCACCA
GGATCTCACGCTGCTCAAAGCGCTCGTGAGACA
GCAACTGCCTGAAAAGTACAAGGAGATCTTCTT
CGACCAGTCCAAGAATGGGTACGCAGGGTACAT
CGATGGAGGCGCTAGCCAGGAAGAGTTCTATAA
GTTTCATCAAGCCAATCCTGGAAAAGATGGACGG
AACCGAAGAACTGCTGGTCAAGCTGAACAGGG
AGGATCTGCTCCGGAAACAGAGAACCTTTGACA
ACGGATCCATTCCCCACCAGATCCATCTGGGTG

AGCTGCACGCCATCTTGCGGCGCCAGGAGGACT
TTTACCCATTCTCAAGGACAACCGGGAAAAGA
TCGAGAAAATTCTGACGTTCCGCATCCCGTATT
ACGTGGGCCCACTGGCGCGCGGCAATTCGCGCT
TCGCGTGGATGACTAGAAAATCAGAGGAAACC
ATCACTCCTTGGAAATTCGAGGAAGTTGTGGAT
AAGGGAGCTTCGGCACAAAGCTTCATCGAACGA
ATGACCAACTTCGACAAGAATCTCCCAAACGAG
AAGGTGCTTCCTAAGCACAGCCTCCTTTACGAA
TACTTCACTGTCTACAACGAACTGACTAAAGTG
AAATACGTTACTGAAGGAATGAGGAAGCCGGC
CTTTCTGTCCGGAGAACAGAAGAAAGCAATTGT
CGATCTGCTGTTCAAGACCAACCGCAAGGTGAC
CGTCAAGCAGCTTAAAGAGGACTACTTCAAGAA
GATCGAGTGTTTCGACTCAGTGGAAATCAGCGG
GGTGGAGGACAGATTCAACGCTTCGCTGGGAAC
CTATCATGATCTCCTGAAGATCATCAAGGACAA
GGACTTCCTTGACAACGAGGAGAACGAGGACAT
CCTGGAAGATATCGTCCTGACCTTGACCCTTTTC
GAGGATCGCGAGATGATCGAGGAGAGGCTTAA
GACCTACGCTCATCTCTTCGACGATAAGGTCAT
GAAACAACCTCAAGCGCCGCGGTACACTGGTTG
GGGCCGCCTCTCCCGCAAGCTGATCAACGGTAT
TCGCGATAAACAGAGCGGTAAAACCTATCCTGGA
TTTCCTCAAATCGGATGGCTTCGCTAATCGTAAC
TTCATGCAATTGATCCACGACGACAGCCTGACC
TTTAAGGAGGACATCCAAAAAGCACAAAGTGTCC
GGACAGGGAGACTCACTCCATGAACACATCGCG
AATCTGGCCGGTTCGCCGGCGATTAAGAAGGGA
ATTCTGCAAACCTGTGAAGGTGGTCGACGAGCTG
GTGAAGGTCATGGGACGGCACAAACCGGAGAA
TATCGTGATTGAAATGGCCCGAGAAAACCAGAC
TACCCAGAAGGGCCAGAAAAACTCCCGCGAAA
GGATGAAGCGGATCGAAGAAGGAATCAAGGAG
CTGGGCAGCCAGATCCTGAAAGAGCACCCGGTG

GAAAACACGCAGCTGCAGAACGAGAAGCTCTA
CCTGTACTATTTGCAAATGGACGGGACATGTA
CGTGGACCAAGAGCTGGACATCAATCGGTTGTC
TGATTACGACGTGGACCACATCGTTCCACAGTC
CTTTCTGAAGGATGACTCGATCGATAACAAGGT
GTTGACTCGCAGCGACAAGAACAGAGGGAAGT
CAGATAATGTGCCATCGGAGGAGGTCGTGAAGA
AGATGAAGAATTACTGGCGGCAGCTCCTGAATG
CGAAGCTGATTACCCAGAGAAAGTTTGACAATC
TACTAAAGCCGAGCGCGGGCGGACTCTCAGAGC
TGGATAAGGCTGGATTCATCAAACGGCAGCTGG
TCGAGACTCGGCAGATTACCAAGCACGTGGCGC
AGATCTTGGACTCCCGCATGAACACTAAATACG
ACGAGAACGATAAGCTCATCCGGGAAGTGAAG
GTGATTACCCTGAAAAGCAAACCTTGTGTCGGAC
TTTCGGAAGGACTTTCAGTTTTACAAAGTGAGA
GAAATCAACAACACTACCATCACGCGCATGACGCA
TACCTCAACGCTGTGGTCGGTACCGCCCTGATC
AAAAAGTACCCTAAACTTGAATCGGAGTTTGTG
TACGGAGACTACAAGGTCTACGACGTGAGGAA
GATGATAGCCAAGTCCGAACAGGAAATCGGGA
AAGCAACTGCGAAATACTTCTTTTACTCAAACA
TCATGAACTTTTTCAAGACTGAAATTACGCTGG
CCAATGGAGAAATCAGGAAGAGGCCACTGATC
GAAACTAACGGAGAAACGGGCGAAATCGTGTG
GGACAAGGGCAGGGACTTCGCAACTGTTTCGCAA
AGTGCTCTCTATGCCGCAAGTCAATATTGTGAA
GAAAACCGAAGTGCAAACCGGCGGATTTTCAA
GGAATCGATCCTCCCAAAGAGAAATAGCGACA
AGCTCATTGCACGCAAGAAAGACTGGGACCCGA
AGAAGTACGGAGGATTCGATTCGCCGACTGTGCG
CATACTCCGTCCCTCGTGGTGGCCAAGGTGGAGA
AGGGAAAGAGCAAAAAGCTCAAATCCGTCAA
GAGCTGCTGGGGATTACCATCATGGAACGATCC
TCGTTGAGAAGAACCCGATTGATTTCTCGAG

	<p>GCGAAGGGTTACAAGGAGGTGAAGAAGGATCT GATCATCAAACCTCCCAAGTACTCACTGTTCTGA ACTGGAAAATGGTCGGAAGCGCATGCTGGCTTC GGCCGGAGAACTCCAAAAAGGAAATGAGCTGG CCTTGCCTAGCAAGTACGTCAACTTCCTCTATCT TGCTTCGCACTACGAAAACTCAAAGGGTCACC GGAAGATAACGAACAGAAGCAGCTTTTCGTGGA GCAGCACAAGCATTATCTGGATGAAATCATCGA ACAAATCTCCGAGTTTTCAAAGCGCGTGATCCT CGCCGACGCCAACCTCGACAAAGTCCTGTCGGC CTACAATAAGCATAGAGATAAGCCGATCAGAG AACAGGCCGAGAACATTATCCACTTGTTCACCC TGACTAACCTGGGAGCCCCAGCCGCCTTCAAGT ACTTCGATACTACTATCGATCGCAAAGATACA CGTCCACCAAGGAAGTTCTGGACGCGACCCTGA TCCACCAAAGCATCACTGGACTCTACGAAACTA GGATCGATCTGTCGCAGCTGGGTGGCGATTGAT AGTCTAGCCATCACATTTAAAAGCATCTCAGCC TACCATGAGAATAAGAGAAAGAAAATGAAGAT CAATAGCTTATTCATCTCTTTTTCTTTTTCGTTGG TGTAAGCCAACACCCTGTCTAAAAACATAAA TTTTCTTAATCATTTTGCCTCTTTTCTCTGTGCTT CAATTAATAAAAAATGGAAAGAACCTCGAG</p>	
<p>ORF Cas 9 с удаленными сплайс соединениями; содержание U 12,75%</p>	<p>ATGGACAAGAAGTACAGCATCGGACTGGACATC GGAACAAACAGCGTCGGATGGGCAGTCATCAC AGACGAATACAAGGTCCCGAGCAAGAAGTTCA AGGTCCTGGGAAACACAGACAGACACAGCATC AAGAAGAACCTGATCGGAGCACTGCTGTTCGAC AGCGGAGAAACAGCAGAAGCAACAAGACTGAA GAGAACAGCAAGAAGAAGATACACAAGAAGAA AGAACAGAATCTGCTACCTGCAGGAAATCTTCA GCAACGAAATGGCAAAGGTCGACGACAGCTTCT TCCACcggCTGGAAGAAAGCTTCCTGGTTCGAAGA AGACAAGAAGCACGAAAGACACCCGATCTTCG GAAACATCGTCGACGAAGTCGCATACCACGAAA</p>	<p>250</p>

AGTACCCGACAATCTACCACCTGAGAAAGAAGC
TGGTCGACAGCACAGACAAGGCAGACCTGAGA
CTGATCTACCTGGCACTGGCACACATGATCAAG
TTCAGAGGACACTTCCTGATCGAAGGAGACCTG
AACCCGGACAACAGCGACGTCGACAAGCTGTTC
ATCCAGCTGGTCCAGACATAACAACCAGCTGTTC
GAAGAAAACCCGATCAACGCAAGCGGAGTCGA
CGCAAAGGCAATCCTGAGCGCAAGACTGAGCA
AGAGCAGAAGACTGGAAAACCTGATCGCACAG
CTGCCGGGAGAAAAGAAGAACGGACTGTTCGG
AAACCTGATCGCACTGAGCCTGGGACTGACACC
GAACTTCAAGAGCAACTTCGACCTGGCAGAAGA
CGCAAAGCTGCAGCTGAGCAAGGACACATACG
ACGACGACCTGGACAACCTGCTGGCACAGATCG
GAGACCAGTACGCAGACCTGTTCTGGCAGCAA
AGAACCTGAGCGACGCAATCCTGCTGAGCGACA
TCCTGAGAGTCAACACAGAAATCACAAAGGCAC
CGCTGAGCGCAAGCATGATCAAGAGATACGAC
GAACACCACCAGGACCTGACACTGCTGAAGGCA
CTGGTCAGACAGCAGCTGCCGGAAAAGTACAA
GGAAATCTTCTTCGACCAGAGCAAGAACGGATA
CGCAGGATACATCGACGGAGGAGCAAGCCAGG
AAGAATTCTACAAGTTCATCAAGCCGATCCTGG
AAAAGATGGACGGAACAGAAGAACTGCTGGTC
AAGCTGAACAGAGAAGACCTGCTGAGAAAGCA
GAGAACATTCGACAACGGAAGCATCCCGCACCA
GATCCACCTGGGAGAACTGCACGCAATCCTGAG
AAGACAGGAAGACTTCTACCCGTTCTGAAGGA
CAACAGAGAAAAGATCGAAAAGATCCTGACAT
TCAGAATCCCGTACTACGTCGGACCGCTGGCAA
GAGGAAACAGCAGATTCGCATGGATGACAAGA
AAGAGCGAAGAAACAATCACACCGTGGA ACTT
CGAAGAAGTCGTCGACAAGGGAGCAAGCGCAC
AGAGCTTCATCGAAAGAATGACAAACTTCGACA
AGAACCTGCCGAACGAAAAGGTCCTGCCGAAG

CACAGCCTGCTGTACGAATACTTCACAGTCTAC
AACGAACTGACAAAGGTCAAGTACGTCACAGA
AGGAATGAGAAAGCCGGCATTCTGAGCGGAG
AACAGAAGAAGGCAATCGTCGACCTGCTGTTCA
AGACAAACAGAAAGGTCACAGTCAAGCAGCTG
AAGGAAGACTACTTCAAGAAGATCGAATGCTTC
GACAGCGTCGAAATCAGCGGAGTCGAAGACAG
ATTCAACGCAAGCCTGGGAACATAACCACGACCT
GCTGAAGATCATCAAGGACAAGGACTTCCTGGA
CAACGAAGAAAACGAAGACATCCTGGAAGACA
TCGTCCTGACACTGACACTGTTTCGAAGACAGAG
AAATGATCGAAGAAAGACTGAAGACATACGCA
CACCTGTTTCGACGACAAGGTCATGAAGCAGCTG
AAGAGAAGAAGATACACAGGATGGGGAAGACT
GAGCAGAAAGCTGATCAACGGAATCAGAGACA
AGCAGAGCGGAAAGACAATCCTGGACTTCCTGA
AGAGCGACGGATTCGCAAACAGAACTTCATGC
AGCTGATCCACGACGACAGCCTGACATTCAAGG
AAGACATCCAGAAGGCACAGGTCAGCGGACAG
GGAGACAGCCTGCACGAACACATCGCAAACCTG
GCAGGAAGCCCGGCAATCAAGAAGGGAATCCT
GCAGACAGTCAAGGTCGTCGACGAACTGGTCAA
GGTCATGGGAAGACACAAGCCGGAAAACATCG
TCATCGAAATGGCAAGAGAAAACCAGACAACA
CAGAAGGGACAGAAGAACAGCAGAGAAAGAAT
GAAGAGAATCGAAGAAGGAATCAAGGAACTGG
GAAGCCAGATCCTGAAGGAACACCCGGTCGAA
AACACACAGCTGCAGAACGAAAAGCTGTACCTG
TACTACCTGCAaAACGGAAGAGACATGTACGTC
GACCAGGAACTGGACATCAACAGACTGAGCGA
CTACGACGTCGACCACATCGTCCCGCAGAGCTT
CCTGAAGGACGACAGCATCGACAACAAGGTCCT
GACAAGAAGCGACAAGAACAGAGGAAAGAGCG
ACAACGTCCCGAGCGAAGAAGTCGTCAAGAAG
ATGAAGAACTACTGGAGACAGCTGCTGAACGCA

AAGCTGATCACACAGAGAAAGTTCGACAACCTG
ACAAAGGCAGAGAGAGGAGGACTGAGCGAACT
GGACAAGGCAGGATTCATCAAGAGACAGCTGG
TCGAAACAAGACAGATCACAAAGCACGTCGCA
CAGATCCTGGACAGCAGAATGAACACAAAGTA
CGACGAAAACGACAAGCTGATCAGAGAAGTCA
AGGTCATCACACTGAAGAGCAAGCTGGTCAGCG
ACTTCAGAAAGGACTTCCAGTTCTACAAGGTCA
GAGAAATCAACAACCTACCACCACGCACACGAC
GCATACCTGAACGCAGTCGTCGGAACAGCACTG
ATCAAGAAGTACCCGAAGCTGGAAAGCGAATTC
GTCTACGGAGACTACAAGGTCTACGACGTCAGA
AAGATGATCGCAAAGAGCGAACAGGAAATCGG
AAAGGCAACAGCAAAGTACTTCTTCTACAGCAA
CATCATGAACTTCTTCAAGACAGAAATCACACT
GGCAAACGGAGAAATCAGAAAGAGACCGCTGA
TCGAAACAACGGAGAAACAGGAGAAATCGTC
TGGGACAAGGGAAGAGACTTCGCAACAGTCAG
AAAGGTCCTGAGCATGCCGCAGGTCAACATCGT
CAAGAAGACAGAAGTCCAGACAGGAGGATTCA
GCAAGGAAAGCATCCTGCCGAAGAGAAACAGC
GACAAGCTGATCGCAAGAAAGAAGGACTGGGA
CCCGAAGAAGTACGGAGGATTCGACAGCCCGA
CAGTCGCATACAGCGTCCTGGTCGTCGCAAAGG
TCGAAAAGGGAAAGAGCAAGAAGCTGAAGAGC
GTCAAGGAACTGCTGGGAATCACAATCATGGAA
AGAAGCAGCTTCGAAAAGAACCCGATCGACTTC
CTGGAAGCAAAGGGATACAAGGAAGTCAAGAA
GGACCTGATCATCAAGCTGCCGAAGTACAGCCT
GTTCGAACTGGAAAACGGAAGAAAGAGAATGC
TGGCAAGCGCAGGAGAACTGCAGAAGGGAAAC
GAACTGGCACTGCCGAGCAAGTACGTCAACTTC
CTGTACCTGGCAAGCCACTACGAAAAGCTGAAG
GGAAGCCCGGAAGACAACGAACAGAAGCAGCT
GTTTCGTCGAACAGCACAAGCACTACCTGGACGA

	<p>AATCATCGAACAGATCAGCGAATTCAGCAAGAG AGTCATCCTGGCAGACGCAAACCTGGACAAGGT CCTGAGCGCATAACAAGCACAGAGACAAGC CGATCAGAGAACAGGCAGAAAACATCATCCAC CTGTTCACTGACAAACCTGGGAGCACCGGCA GCATTCAAGTACTTCGACACAACAATCGACAGA AAGAGATACACAAGCACAAAGGAAGTCCTGGA CGCAAACTGATCCACCAGAGCATCACAGGACT GTACGAAACAAGAATCGACCTGAGCCAGCTGG GAGGAGACGGAGGAGGAAGCCCGAAGAAGAAG AGAAAGGTCTAG</p>	
<p>Транскрипт Cas 9 с 5' UTR к HSD, ORF, соответствующая SEQ ID №: 250, последо вательность Kozak и 3' UTR к ALB</p>	<p>GGGTCCCGCAGTCGGCGTCCAGCGGCTCTGCTT GTTTCGTGTGTGTGTCGTTGCAGGCCTTATTCGGA TCCGCCACCATGGACAAGAAGTACAGCATCGGA CTGGACATCGGAACAAACAGCGTCGGATGGGC AGTCATCACAGACGAATACAAGGTCCCGAGCAA GAAGTTCAAGGTCCTGGGAAACACAGACAGAC ACAGCATCAAGAAGAACCTGATCGGAGCACTGC TGTTTCGACAGCGGAGAAACAGCAGAAGCAACA AGACTGAAGAGAACAGCAAGAAGAAGATACAC AAGAAGAAAGAACAGAATCTGCTACCTGCAGG AAATCTTCAGCAACGAAATGGCAAAGGTCGACG ACAGCTTCTTCCACcggCTGGAAGAAAGCTTCCT GGTCGAAGAAGACAAGAAGCACGAAAGACACC CGATCTTCGGAAACATCGTCGACGAAGTCGCAT ACCACGAAAAGTACCCGACAATCTACCACCTGA GAAAGAAGCTGGTCGACAGCACAGACAAGGCA GACCTGAGACTGATCTACCTGGCACTGGCACAC ATGATCAAGTTCAGAGGACACTTCCTGATCGAA GGAGACCTGAACCCGGACAACAGCGACGTCGA CAAGCTGTTTCATCCAGCTGGTCCAGACATACAA CCAGCTGTTTCGAAGAAAACCCGATCAACGCAAG CGGAGTCGACGCAAAGGCAATCCTGAGCGCAA GACTGAGCAAGAGCAGAAGACTGGAAAACCTG ATCGCACAGCTGCCGGGAGAAAAGAAGAACGG</p>	<p>251</p>

ACTGTTTCGGAAACCTGATCGCACTGAGCCTGGG
ACTGACACCGAACTTCAAGAGCAACTTCGACCT
GGCAGAAGACGCAAAGCTGCAGCTGAGCAAGG
ACACATACGACGACGACCTGGACAACCTGCTGG
CACAGATCGGAGACCAGTACGCAGACCTGTTCC
TGGCAGCAAAGAACCTGAGCGACGCAATCCTGC
TGAGCGACATCCTGAGAGTCAACACAGAAATCA
CAAAGGCACCGCTGAGCGCAAGCATGATCAAG
AGATACGACGAACACCACCAGGACCTGACACTG
CTGAAGGCACTGGTCAGACAGCAGCTGCCGGAA
AAGTACAAGGAAATCTTCTTCGACCAGAGCAAG
AACGGATACGCAGGATACATCGACGGAGGAGC
AAGCCAGGAAGAATTCTACAAGTTCATCAAGCC
GATCCTGGAAAAGATGGACGGAACAGAAGAAC
TGCTGGTCAAGCTGAACAGAGAAGACCTGCTGA
GAAAGCAGAGAACATTCGACAACGGAAGCATC
CCGCACCAGATCCACCTGGGAGAACTGCACGCA
ATCCTGAGAAGACAGGAAGACTTCTACCCGTTC
CTGAAGGACAACAGAGAAAAGATCGAAAAGAT
CCTGACATTCAGAATCCCGTACTACGTCCGACC
GCTGGCAAGAGGAAACAGCAGATTTCGCATGGA
TGACAAGAAAGAGCGAAGAAACAATCACACCG
TGGAACTTCGAAGAAGTCGTCGACAAGGGAGC
AAGCGCACAGAGCTTCATCGAAAGAATGACAA
ACTTCGACAAGAACCTGCCGAACGAAAAGGTCC
TGCCGAAGCACAGCCTGCTGTACGAATACTTCA
CAGTCTACAACGAACTGACAAAGGTCAAGTACG
TCACAGAAGGAATGAGAAAGCCGGCATTCTGA
GCGGAGAACAGAAGAAGGCAATCGTCGACCTG
CTGTTCAAGACAAACAGAAAGGTCACAGTCAAG
CAGCTGAAGGAAGACTACTTCAAGAAGATCGA
ATGCTTCGACAGCGTCGAAATCAGCGGAGTCGA
AGACAGATTCAACGCAAGCCTGGGAACATACCA
CGACCTGCTGAAGATCATCAAGGACAAGGACTT
CCTGGACAACGAAGAAAACGAAGACATCCTGG

AAGACATCGTCCTGACACTGACACTGTTCGAAG
ACAGAGAAATGATCGAAGAAAGACTGAAGACA
TACGCACACCTGTTCGACGACAAGGTCATGAAG
CAGCTGAAGAGAAGAAGATACACAGGATGGGG
AAGACTGAGCAGAAAGCTGATCAACGGAATCA
GAGACAAGCAGAGCGGAAAGACAATCCTGGAC
TTCCTGAAGAGCGACGGATTTCGCAAACAGAAAC
TTCATGCAGCTGATCCACGACGACAGCCTGACA
TTCAAGGAAGACATCCAGAAGGCACAGGTCAG
CGGACAGGGAGACAGCCTGCACGAACACATCG
CAAACCTGGCAGGAAGCCCGGCAATCAAGAAG
GGAATCCTGCAGACAGTCAAGGTCGTCGACGAA
CTGGTCAAGGTCATGGGAAGACACAAGCCGGA
AAACATCGTCATCGAAATGGCAAGAGAAAACC
AGACAACACAGAAGGGACAGAAGAACAGCAGA
GAAAGAATGAAGAGAATCGAAGAAGGAATCAA
GGAACTGGGAAGCCAGATCCTGAAGGAACACC
CGGTCGAAAACACACAGCTGCAGAACGAAAAG
CTGTACCTGTACTACCTGCAaAACGGAAGAGAC
ATGTACGTCGACCAGGAACTGGACATCAACAGA
CTGAGCGACTACGACGTCGACCACATCGTCCCG
CAGAGCTTCCTGAAGGACGACAGCATCGACAAC
AAGGTCCTGACAAGAAGCGACAAGAACAGAGG
AAAGAGCGACAACGTCCCGAGCGAAGAAGTCG
TCAAGAAGATGAAGA ACTACTGGAGACAGCTG
CTGAACGCAAAGCTGATCACACAGAGAAAGTTC
GACAACCTGACAAAGGCAGAGAGAGGAGGACT
GAGCGAACTGGACAAGGCAGGATTCATCAAGA
GACAGCTGGTCGAAACAAGACAGATCACAAAG
CACGTCGCACAGATCCTGGACAGCAGAATGAAC
ACAAAGTACGACGAAAACGACAAGCTGATCAG
AGAAGTCAAGGTCATCACACTGAAGAGCAAGCT
GGTCAGCGACTTCAGAAAGGACTTCCAGTTCTA
CAAGGTCAGAGAAATCAACA ACTACCACCACGC
ACACGACGCATACCTGAACGCAGTCGTCGGAAC

AGCACTGATCAAGAAGTACCCGAAGCTGGAAA
GCGAATTCGTCTACGGAGACTACAAGGTCTACG
ACGTCAGAAAGATGATCGCAAAGAGCGAACAG
GAAATCGGAAAGGCAACAGCAAAGTACTTCTTC
TACAGCAACATCATGAACTTCTTCAAGACAGAA
ATCACACTGGCAAACGGAGAAATCAGAAAGAG
ACCGCTGATCGAAACAAACGGAGAAACAGGAG
AAATCGTCTGGGACAAGGGAAGAGACTTCGCA
ACAGTCAGAAAGGTCCTGAGCATGCCGCAGGTC
AACATCGTCAAGAAGACAGAAGTCCAGACAGG
AGGATTCAGCAAGGAAAGCATCCTGCCGAAGA
GAAACAGCGACAAGCTGATCGCAAGAAAGAAG
GACTGGGACCCGAAGAAGTACGGAGGATTCTGA
CAGCCCGACAGTCGCATACAGCGTCCTGGTTCGT
CGCAAAGGTCGAAAAGGGAAAGAGCAAGAAGC
TGAAGAGCGTCAAGGAACTGCTGGGAATCACA
ATCATGGAAAGAAGCAGCTTCGAAAAGAACC
GATCGACTTCTGGAAGCAAAGGGATAACAAGG
AAGTCAAGAAGGACCTGATCATCAAGCTGCCGA
AGTACAGCCTGTTCGAACTGGAAAACGGAAGA
AAGAGAATGCTGGCAAGCGCAGGAGAACTGCA
GAAGGGAAACGAACTGGCACTGCCGAGCAAGT
ACGTCAACTTCTGTACCTGGCAAGCCACTACG
AAAAGCTGAAGGGAAGCCCGGAAGACAACGAA
CAGAAGCAGCTGTTCGTCGAACAGCACAAAGCAC
TACCTGGACGAAATCATCGAACAGATCAGCGAA
TTCAGCAAGAGAGTCATCCTGGCAGACGCAAAC
CTGGACAAGGTCCTGAGCGCATAACAAGCAC
AGAGACAAGCCGATCAGAGAACAGGCAGAAAA
CATCATCCACCTGTTCACACTGACAAACCTGGG
AGCACCGGCAGCATTCAAGTACTTCGACACAAC
AATCGACAGAAAGAGATACACAAGCACAAAGG
AAGTCCTGGACGCAAACTGATCCACCAGAGCA
TCACAGGACTGTACGAAACAAGAATCGACCTGA
GCCAGCTGGGAGGAGACGGAGGAGGAAGCCCG

	<p>AAGAAGAAGAGAAAGGTCTAGCTAGCCATCAC ATTTAAAAGCATCTCAGCCTACCATGAGAATAA GAGAAAGAAAATGAAGATCAATAGCTTATTCAT CTCTTTTTCTTTTTCGTTGGTGTAAAGCCAACAC CCTGTCTAAAAAACATAAATTTCTTTAATCATT TGCCTCTTTTCTCTGTGCTTCAATTAATAAAAA TGGAAGAACCTCGAG</p>	
<p>ORF Cas 9 с минимальными кодонами уридина, в общем часто используемыми у человека; содержание U 12,75%</p>	<p>ATGGACAAGAAGTACAGCATCGGCCTGGACATC GGCACCAACAGCGTGGGCTGGGCCGTGATCACC GACGAGTACAAGGTGCCAGCAAGAAGTTCAA GGTGCTGGGCAACACCGACAGACACAGCATCA AGAAGAACCTGATCGGCGCCCTGCTGTTGACA GCGGCGAGACCGCCGAGGCCACCAGACTGAAG AGAACCGCCAGAAGAAGATACACCAGAAGAAA GAACAGAATCTGCTACCTGCAGGAGATCTCAG CAACGAGATGGCCAAGGTGGACGACAGCTTCTT CCACAGACTGGAGGAGAGCTTCCTGGTGGAGGA GGACAAGAAGCACGAGAGACACCCCATCTTCG GCAACATCGTGGACGAGGTGGCCTACCACGAGA AGTACCCACCATCTACCACCTGAGAAAGAAGC TGGTGGACAGCACCGACAAGGCCGACCTGAGA CTGATCTACCTGGCCCTGGCCCACATGATCAAG TTCAGAGGCCACTTCCTGATCGAGGGCGACCTG AACCCCGACAACAGCGACGTGGACAAGCTGTTC ATCCAGCTGGTGCAGACCTACAACCAGCTGTTC GAGGAGAACCCCATCAACGCCAGCGGCGTGGA CGCCAAGGCCATCCTGAGCGCCAGACTGAGCAA GAGCAGAAGACTGGAGAACCTGATCGCCCAGCT GCCC GCGAGAAGAAGAACGGCCTGTTCGGCA ACCTGATCGCCCTGAGCCTGGGCCTGACCCCA ACTTCAAGAGCAACTTCGACCTGGCCGAGGACG CCAAGCTGCAGCTGAGCAAGGACACCTACGACG ACGACCTGGACAACCTGCTGGCCCAGATCGGCG ACCAGTACGCCGACCTGTTCCTGGCCGCCAAGA ACCTGAGCGACGCCATCCTGCTGAGCGACATCC</p>	<p>252</p>

TGAGAGTGAACACCGAGATCACCAAGGCCCCCC
TGAGCGCCAGCATGATCAAGAGATACGACGAG
CACCACCAGGACCTGACCCTGCTGAAGGCCCTG
GTGAGACAGCAGCTGCCCCGAGAAGTACAAGGA
GATCTTCTTCGACCAGAGCAAGAACGGCTACGC
CGGCTACATCGACGGCGGCCAGCCAGGAGG
AGTTCTACAAGTTCATCAAGCCCATCCTGGAGA
AGATGGACGGCACCGAGGAGCTGCTGGTGAAG
CTGAACAGAGAGGACCTGCTGAGAAAGCAGAG
AACCTTCGACAACGGCAGCATCCCCACCAGAT
CCACCTGGGCGAGCTGCACGCCATCCTGAGAAG
ACAGGAGGACTTCTACCCCTTCCTGAAGGACAA
CAGAGAGAAGATCGAGAAGATCCTGACCTTCAG
AATCCCCTACTACGTGGGCCCCCTGGCCAGAGG
CAACAGCAGATTCGCCTGGATGACCAGAAAGA
GCGAGGAGACCATCACCCCTGGA ACTTCGAGG
AGGTGGTGGACAAGGGCGCCAGCGCCCAGAGC
TTCATCGAGAGAATGACCAACTTCGACAAGAAC
CTGCCCAACGAGAAGGTGCTGCCAAGCACAGC
CTGCTGTACGAGTACTTCACCGTGTACAACGAG
CTGACCAAGGTGAAGTACGTGACCGAGGGCATG
AGAAAGCCCGCCTTCCTGAGCGGCGAGCAGAA
GAAGGCCATCGTGGACCTGCTGTTCAAGACCAA
CAGAAAGGTGACCGTGAAGCAGCTGAAGGAGG
ACTACTTCAAGAAGATCGAGTGCTTCGACAGCG
TGGAGATCAGCGGCGTGGAGGACAGATTCAAC
GCCAGCCTGGGCACCTACCACGACCTGCTGAAG
ATCATCAAGGACAAGGACTTCCTGGACAACGAG
GAGAACGAGGACATCCTGGAGGACATCGTGCTG
ACCCTGACCCTGTTCGAGGACAGAGAGATGATC
GAGGAGAGACTGAAGACCTACGCCACCTGTTC
GACGACAAGGTGATGAAGCAGCTGAAGAGAAG
AAGATACACCGGCTGGGGCAGACTGAGCAGAA
AGCTGATCAACGGCATCAGAGACAAGCAGAGC
GGCAAGACCATCCTGGACTTCCTGAAGAGCGAC

GGCTTCGCCAACAGAACTTCATGCAGCTGATC
CACGACGACAGCCTGACCTTCAAGGAGGACATC
CAGAAGGCCAGGTGAGCGGCCAGGGCGACAG
CCTGCACGAGCACATCGCCAACCTGGCCGGCAG
CCCCGCCATCAAGAAGGGCATCCTGCAGACCGT
GAAGGTGGTGGACGAGCTGGTGAAGGTGATGG
GCAGACACAAGCCCGAGAACATCGTGATCGAG
ATGGCCAGAGAGAACCAGACCACCCAGAAGGG
CCAGAAGAACAGCAGAGAGAGAATGAAGAGAA
TCGAGGAGGGCATCAAGGAGCTGGGCAGCCAG
ATCCTGAAGGAGACCCCGTGGAGAACACCCAG
CTGCAGAACGAGAAGCTGTACCTGTACTACCTG
CAGAACGGCAGAGACATGTACGTGGACCAGGA
GCTGGACATCAACAGACTGAGCGACTACGACGT
GGACCACATCGTGCCCCAGAGCTTCCTGAAGGA
CGACAGCATCGACAACAAGGTGCTGACCAGAA
GCGACAAGAACAGAGGCAAGAGCGACAACGTG
CCCAGCGAGGAGGTGGTGAAGAAGATGAAGAA
CTACTGGAGACAGCTGCTGAACGCCAAGCTGAT
CACCCAGAGAAAGTTCGACAACCTGACCAAGGC
CGAGAGAGGGCGCCTGAGCGAGCTGGACAAGG
CCGGCTTCATCAAGAGACAGCTGGTGGAGACCA
GACAGATCACCAAGCACGTGGCCCAGATCCTGG
ACAGCAGAATGAACACCAAGTACGACGAGAAC
GACAAGCTGATCAGAGAGGTGAAGGTGATCAC
CCTGAAGAGCAAGCTGGTGAAGGACTTCAGAAA
GGACTTCCAGTTCTACAAGGTGAGAGAGATCAA
CAACTACCACCACGCCACGACGCCTACCTGAA
CGCCGTGGTGGGCACCGCCCTGATCAAGAAGTA
CCCCAAGCTGGAGAGCGAGTTCGTGTACGGCGA
CTACAAGGTGTACGACGTGAGAAAGATGATCGC
CAAGAGCGAGCAGGAGATCGGCAAGGCCACCG
CCAAGTACTTCTTCTACAGCAACATCATGAACTT
CTTCAAGACCGAGATCACCCCTGGCCAACGGCGA
GATCAGAAAGAGACCCCTGATCGAGACCAACG

	<p>GCGAGACCGGCGAGATCGTGTGGGACAAGGGC AGAGACTTCGCCACCGTGAGAAAGGTGCTGAGC ATGCCCCAGGTGAACATCGTGAAGAAGACCGA GGTGCAGACCGGCGGCTTCAGCAAGGAGAGCA TCCTGCCCAAGAGAAACAGCGACAAGCTGATCG CCAGAAAGAAGGACTGGGACCCCAAGAAGTAC GGCGGCTTCGACAGCCCCACCGTGGCCTACAGC GTGCTGGTGGTGGCCAAGGTGGAGAAGGGCAA GAGCAAGAAGCTGAAGAGCGTGAAGGAGCTGC TGGGCATCACCATCATGGAGAGAAGCAGCTTCG AGAAGAACCCCATCGACTTCCTGGAGGCCAAGG GCTACAAGGAGGTGAAGAAGGACCTGATCATC AAGCTGCCCAAGTACAGCCTGTTCGAGCTGGAG AACGGCAGAAAGAGAATGCTGGCCAGCGCCGG CGAGCTGCAGAAGGGCAACGAGCTGGCCCTGCC CAGCAAGTACGTGAACTTCCTGTACCTGGCCAG CCACTACGAGAAGCTGAAGGGCAGCCCCGAGG ACAACGAGCAGAAGCAGCTGTTCGTGGAGCAG CACAAGCACTACCTGGACGAGATCATCGAGCAG ATCAGCGAGTTCAGCAAGAGAGTGATCCTGGCC GACGCCAACCTGGACAAGGTGCTGAGCGCCTAC AACAAGCACAGAGACAAGCCCATCAGAGAGCA GGCCGAGAACATCATCCACCTGTTCACCCTGAC CAACCTGGGCGCCCCCGCCGCTTCAAGTACTT CGACACCACCATCGACAGAAAGAGATACACCA GCACCAAGGAGGTGCTGGACGCCACCCTGATCC ACCAGAGCATCACCGGCTGTACGAGACCAGAA TCGACCTGAGCCAGCTGGGCGGCGACGGCGGCG GCAGCCCCAAGAAGAAGAGAAAGGTGTGA</p>	
<p>Транскрипт Cas 9 с 5' UTR к HSD, ORF, соответствующая SEQ ID №: 252, последовательность Kozak и 3' UTR к ALB</p>	<p>GGGTCCCGCAGTCGGCGTCCAGCGGCTCTGCTT GTTCGTGTGTGTGTCGTTGCAGGCCTTATTCGGA TCCGCCACCATGGACAAGAAGTACAGCATCGGC CTGGACATCGGCACCAACAGCGTGGGCTGGGCC GTGATCACCGACGAGTACAAGGTGCCCAGCAAG AAGTTCAAGGTGCTGGGCAACACCGACAGACAC</p>	253

AGCATCAAGAAGAACCTGATCGGCGCCCTGCTG
TTCGACAGCGGCGAGACCGCCGAGGCCACCAG
ACTGAAGAGAACCGCCAGAAGAAGATACACCA
GAAGAAAGAACAGAATCTGCTACCTGCAGGAG
ATCTTCAGCAACGAGATGGCCAAGGTGGACGAC
AGCTTCTTCCACAGACTGGAGGAGAGCTTCCTG
GTGGAGGAGGACAAGAAGCACGAGAGACACCC
CATCTTCGGCAACATCGTGGACGAGGTGGCCTA
CCACGAGAAGTACCCACCATCTACCACCTGAG
AAAGAAGCTGGTGGACAGCACCGACAAGGCCG
ACCTGAGACTGATCTACCTGGCCCTGGCCACA
TGATCAAGTTCAGAGGCCACTTCCTGATCGAGG
GCGACCTGAACCCCGACAACAGCGACGTGGAC
AAGCTGTTCATCCAGCTGGTGCAGACCTACAAC
CAGCTGTTCGAGGAGAACCCCATCAACGCCAGC
GGCGTGGACGCCAAGGCCATCCTGAGCGCCAGA
CTGAGCAAGAGCAGAAGACTGGAGAACCTGAT
CGCCAGCTGCCCGGCGAGAAGAAGAACGGCC
TGTTCCGGCAACCTGATCGCCCTGAGCCTGGGCC
TGACCCCCAACTTCAAGAGCAACTTCGACCTGG
CCGAGGACGCCAAGCTGCAGCTGAGCAAGGAC
ACCTACGACGACGACCTGGACAACCTGCTGGCC
CAGATCGGCGACCAGTACGCCGACCTGTTCTG
GCCGCCAAGAACCTGAGCGACGCCATCCTGCTG
AGCGACATCCTGAGAGTGAACACCGAGATCACC
AAGGCCCCCCTGAGCGCCAGCATGATCAAGAGA
TACGACGAGCACCACCAGGACCTGACCCTGCTG
AAGGCCCTGGTGAAGACAGCAGCTGCCCGAGAA
GTACAAGGAGATCTTCTTCGACCAGAGCAAGAA
CGGCTACGCCGGCTACATCGACGGCGGCCAG
CCAGGAGGAGTTCTACAAGTTCATCAAGCCCAT
CCTGGAGAAGATGGACGGCACCGAGGAGCTGC
TGGTGAAGCTGAACAGAGAGGACCTGCTGAGA
AAGCAGAGAACCTTCGACAACGGCAGCATCCCC
CACCAGATCCACCTGGGCGAGCTGCACGCCATC

CTGAGAAGACAGGAGGACTTCTACCCCTTCCTG
AAGGACAACAGAGAGAAGATCGAGAAGATCCT
GACCTTCAGAATCCCCTACTACGTGGGCCCCCT
GGCCAGAGGCAACAGCAGATTTCGCTGGATGAC
CAGAAAGAGCGAGGAGACCATCACCCCCTGGA
ACTTCGAGGAGGTGGTGGACAAGGGCGCCAGC
GCCCAGAGCTTCATCGAGAGAATGACCAACTTC
GACAAGAACCTGCCCAACGAGAAGGTGCTGCCC
AAGCACAGCCTGCTGTACGAGTACTTCACCGTG
TACAACGAGCTGACCAAGGTGAAGTACGTGACC
GAGGGCATGAGAAAGCCCGCCTTCTGAGCGGC
GAGCAGAAGAAGGCCATCGTGGACCTGCTGTTC
AAGACCAACAGAAAGGTGACCGTGAAGCAGCT
GAAGGAGGACTACTTCAAGAAGATCGAGTGCTT
CGACAGCGTGGAGATCAGCGGCGTGGAGGACA
GATTCAACGCCAGCCTGGGCACCTACCACGACC
TGCTGAAGATCATCAAGGACAAGGACTTCCTGG
ACAACGAGGAGAACGAGGACATCCTGGAGGAC
ATCGTGCTGACCCTGACCCTGTTCGAGGACAGA
GAGATGATCGAGGAGAGACTGAAGACCTACGC
CCACCTGTTCGACGACAAGGTGATGAAGCAGCT
GAAGAGAAGAAGATACACCGGCTGGGGCAGAC
TGAGCAGAAAGCTGATCAACGGCATCAGAGAC
AAGCAGAGCGGCAAGACCATCCTGGACTTCCTG
AAGAGCGACGGCTTCGCCAACAGAACTTCATG
CAGCTGATCCACGACGACAGCCTGACCTCAAG
GAGGACATCCAGAAGGCCAGGTGAGCGGCCA
GGGCGACAGCCTGCACGAGCACATCGCCAACCT
GGCCGGCAGCCCCGCCATCAAGAAGGGCATCCT
GCAGACCGTGAAGGTGGTGGACGAGCTGGTGA
AGGTGATGGGCAGACACAAGCCCGAGAACATC
GTGATCGAGATGGCCAGAGAGAACCAGACCAC
CCAGAAGGGCCAGAAGAACAGCAGAGAGAGAA
TGAAGAGAATCGAGGAGGGCATCAAGGAGCTG
GGCAGCCAGATCCTGAAGGAGCACCCCGTGGA

GAACACCCAGCTGCAGAACGAGAAGCTGTACCT
GTACTACCTGCAGAACGGCAGAGACATGTACGT
GGACCAGGAGCTGGACATCAACAGACTGAGCG
ACTACGACGTGGACCACATCGTGCCCCAGAGCT
TCCTGAAGGACGACAGCATCGACAACAAGGTGC
TGACCAGAAGCGACAAGAACAGAGGCAAGAGC
GACAACGTGCCAGCGAGGAGGTGGTGAAGAA
GATGAAGAACTACTGGAGACAGCTGCTGAACGC
CAAGCTGATCACCCAGAGAAAGTTCGACAACCT
GACCAAGGCCGAGAGAGGGCGGCCTGAGCGAGC
TGGACAAGGCCGGCTTCATCAAGAGACAGCTGG
TGGAGACCAGACAGATCACCAAGCACGTGGCCC
AGATCCTGGACAGCAGAATGAACACCAAGTAC
GACGAGAACGACAAGCTGATCAGAGAGGTGAA
GGTGATCACCTGAAGAGCAAGCTGGTGAAGCGA
CTTCAGAAAGGACTTCCAGTTCTACAAGGTGAG
AGAGATCAACAACCTACCACCACGCCACGACGC
CTACCTGAACGCCGTGGTGGGCACCGCCCTGAT
CAAGAAGTACCCCAAGCTGGAGAGCGAGTTCGT
GTACGGCGACTACAAGGTGTACGACGTGAGAA
AGATGATCGCCAAGAGCGAGCAGGAGATCGGC
AAGGCCACCGCCAAGTACTTCTTCTACAGCAAC
ATCATGAACTTCTTCAAGACCGAGATCACCCCTG
GCCAACGGCGAGATCAGAAAGAGACCCCTGAT
CGAGACCAACGGCGAGACCGGCGAGATCGTGT
GGGACAAGGGCAGAGACTTCGCCACCGTGAGA
AAGGTGCTGAGCATGCCCCAGGTGAACATCGTG
AAGAAGACCGAGGTGCAGACCGGCGGCTTCAG
CAAGGAGAGCATCCTGCCAAGAGAAACAGCG
ACAAGCTGATCGCCAGAAAGAAGGACTGGGAC
CCCAAGAAGTACGGCGGCTTCGACAGCCCCACC
GTGGCCTACAGCGTGCTGGTGGTGGCCAAGGTG
GAGAAGGGCAAGAGCAAGAAGCTGAAGAGCGT
GAAGGAGCTGCTGGGCATCACCATCATGGAGAG
AAGCAGCTTCGAGAAGAACCCCATCGACTTCCT

	<p>GGAGGCCAAGGGCTACAAGGAGGTGAAGAAGG ACCTGATCATCAAGCTGCCCAAGTACAGCCTGT TCGAGCTGGAGAACGGCAGAAAGAGAATGCTG GCCAGCGCCGGCGAGCTGCAGAAGGGCAACGA GCTGGCCCTGCCCAGCAAGTACGTGAACTTCCT GTACCTGGCCAGCCACTACGAGAAGCTGAAGGG CAGCCCCGAGGACAACGAGCAGAAGCAGCTGT TCGTGGAGCAGCACAAAGCACTACCTGGACGAGA TCATCGAGCAGATCAGCGAGTTCAGCAAGAGAG TGATCCTGGCCGACGCCAACCTGGACAAGGTGC TGAGCGCCTACAACAAGCACAGAGACAAGCCC ATCAGAGAGCAGGCCGAGAACATCATCCACCTG TTCACCCTGACCAACCTGGGCGCCCCCGCCGCC TTCAAGTACTTCGACACCACCATCGACAGAAAG AGATACACCAGCACCAAGGAGGTGCTGGACGC CACCTGATCCACCAGAGCATCACCGGCCTGTA CGAGACCAGAATCGACCTGAGCCAGCTGGGCG GCGACGGCGGCAGCCCCAAGAAGAAGAGA AAGGTGTGACTAGCCATCACATTTAAAAGCATC TCAGCCTACCATGAGAATAAGAGAAAGAAAAT GAAGATCAATAGCTTATTCATCTCTTTTCTTTT TCGTTGGTGTAAAGCCAACACCCTGTCTAAAAA ACATAAATTTCTTTAATCATTTTGCCTCTTTTCTC TGTGCTTCAATTAATAAAAAATGGAAAGAACCT CGAG</p>	
<p>ORF Cas 9 с минимальными кодонами уридина, в общем часто используемыми у человека; содержание U 12,75%</p>	<p>ATGGACA AAAAATAACAGCATAGGGCTAGACAT AGGGACGAACAGCGTAGGGTGGGCGGTAATAA CGGACGAATACAAAGTACCGAGCAAAAATTC AAAGTACTAGGGAACACGGACCGACACAGCAT AAAAAAAAACCTAATAGGGGCGCTACTATTCGA CAGCGGGGAAACGGCGGAAGCGACGCGACTAA AACGAACGGCGCGACGACGATACACGCGACGA AAAAACCGAATATGCTACCTACAAGAAATATTC AGCAACGAAATGGCGAAAGTAGACGACAGCTT CTTCCACCGACTAGAAGAAAGCTTCCTAGTAGA</p>	<p>254</p>

AGAAGACAAAAACACGAACGACACCCGATAT
TCGGGAACATAGTAGACGAAGTAGCGTACCACG
AAAAATACCCGACGATATACCACCTACGAAAA
AACTAGTAGACAGCACGGACAAAGCGGACCTA
CGACTAATATACCTAGCGCTAGCGCACATGATA
AAATTCCGAGGGCACTTCCTAATAGAAGGGGAC
CTAAACCCGGACAACAGCGACGTAGACAAACT
ATTCATACAACTAGTACAAACGTACAACCAACT
ATTCGAAGAAAACCCGATAAACGCGAGCGGGG
TAGACGCGAAAGCGATACTAAGCGCGCGACTA
AGCAAAGCCGACGACTAGAAAACCTAATAGC
GCAACTACCGGGGAAAAAAAAAACGGGCTAT
TCGGGAACCTAATAGCGCTAAGCCTAGGGCTAA
CGCCGAACCTCAAAGCAACTTCGACCTAGCGG
AAGACGCGAAACTACAATAAGCAAAGACACG
TACGACGACGACCTAGACAACCTACTAGCGCAA
ATAGGGGACCAATACGCGGACCTATTCCTAGCG
GCGAAAAACCTAAGCGACGCGATACTACTAAGC
GACATACTACGAGTAAACACGGAAATAACGAA
AGCGCCGCTAAGCGCGAGCATGATAAACGAT
ACGACGAACACCACCAAGACCTAACGCTACTAA
AAGCGCTAGTACGACAACAATAACCGAAAAA
TACAAAGAAATATTCTTCGACCAAAGCAAAAAC
GGGTACGCGGGGTACATAGACGGGGGGGCGAG
CCAAGAAGAATTCTACAAATTCATAAACCGAT
ACTAGAAAAATGGACGGGACGGAAGAACTAC
TAGTAAAATAAACCGAGAAGACCTACTACGAA
ACAACGAACGTTTCGACAACGGGAGCATAACCG
CACCAAATACACCTAGGGGAACTACACGCGATA
CTACGACGACAAGAAGACTTCTACCCGTTCTA
AAAGACAACCGAGAAAAAATAGAAAAAATACT
AACGTTCCGAATACCGTACTACGTAGGGCCGCT
AGCGCGAGGGAACAGCCGATTCGCGTGGATGA
CGCGAAAAAGCGAAGAAACGATAACGCCGTGG
AACTTCGAAGAAGTAGTAGACAAAGGGGCGAG

CGCGCAAAGCTTCATAGAACGAATGACGAACTT
CGACAAAAACCTACCGAACGAAAAAGTACTAC
CGAAACACAGCCTACTATACGAATACTTCACGG
TATACAACGAACTAACGAAAGTAAAATACGTAA
CGGAAGGGATGCGAAAACCGGCGTTCCTAAGC
GGGGAACAAAAAAAAGCGATAGTAGACCTACT
ATTCAAAACGAACCGAAAAGTAACGGTAAAAC
AACTAAAAGAAGACTACTTCAAAAAAATAGAA
TGCTTCGACAGCGTAGAAATAAGCGGGGTAGAA
GACCGATTCAACGCGAGCCTAGGGACGTACCAC
GACCTACTAAAAATAATAAAAGACAAAGACTTC
CTAGACAACGAAGAAAACGAAGACATACTAGA
AGACATAGTACTAACGCTAACGCTATTCGAAGA
CCGAGAAATGATAGAAGAACGACTAAAACGT
ACGCGCACCTATTCGACGACAAAGTAATGAAAC
AACTAAAACGACGACGATACACGGGGTGGGGG
CGACTAAGCCGAAAATAATAAACGGGATACG
AGACAAACAAAGCGGGAAAACGATACTAGACT
TCCTAAAAGCGACGGGTTCGCGAACCGAACT
TCATGCAACTAATACACGACGACAGCCTAACGT
TCAAAGAAGACATACAAAAAGCGCAAGTAAGC
GGGCAAGGGGACAGCCTACACGAACACATAGC
GAACCTAGCGGGGAGCCCGGCGATAAAAAAAG
GGATACTACAAACGGTAAAAGTAGTAGACGAA
CTAGTAAAAGTAATGGGGCGACACAAACCGGA
AAACATAGTAATAGAAATGGCGCGAGAAAACC
AAACGACGCAAAAAGGGCAAAAAAACAGCCGA
GAACGAATGAAACGAATAGAAGAAGGGATAAA
AGAACTAGGGAGCCAATACTAAAAGAACC
CGGTAGAAAACACGCAACTACAAAACGAAAAA
CTATACCTATACTACCTACAAAACGGGCGAGAC
ATGTACGTAGACCAAGAACTAGACATAAACCGA
CTAAGCGACTACGACGTAGACCACATAGTACCG
CAAAGCTTCCTAAAAGACGACAGCATAGACAAC
AAAGTACTAACGCGAAGCGACAAAACCGAGG

GAAAAGCGACAACGTACCGAGCGAAGAAGTAG
TAAAAAAAATGAAAACTACTGGCGACAATA
CTAACCGGAACTAATAACGCAACGAAAATTC
GACAACCTAACGAAAGCGGAACGAGGGGGGCT
AAGCGAACTAGACAAAGCGGGGTTCATAAAC
GACAACCTAGTAGAAACGCGACAAATAACGAAA
CACGTAGCGCAAATACTAGACAGCCGAATGAAC
ACGAAATACGACGAAAACGACAACTAATACG
AGAAGTAAAAGTAATAACGCTAAAAAGCAAAC
TAGTAAGCGACTTCCGAAAAGACTTCCAATTCT
ACAAAGTACGAGAAATAACAACCTACCACCAC
GCGCACGACGCGTACCTAAACGCGGTAGTAGGG
ACGGCGCTAATAAAAAAATACCCGAACTAGA
AAGCGAATTCGTATACGGGGACTACAAAGTATA
CGACGTACGAAAAATGATAGCGAAAAGCGAAC
AAGAAATAGGGAAAGCGACGGCGAAATACTTC
TTCTACAGCAACATAATGAACTTCTTCAAACG
GAAATAACGCTAGCGAACGGGGAAATACGAAA
ACGACCGCTAATAGAAACGAACGGGGAAACGG
GGGAAATAGTATGGGACAAAGGGCGAGACTTC
GCGACGGTACGAAAAGTACTAAGCATGCCGCA
AGTAAACATAGTAAAAAAAACGGAAGTACAAA
CGGGGGGGTTCAGCAAAGAAAGCATACTACCG
AAACGAAACAGCGACAACTAATAGCGCGAAA
AAAAGACTGGGACCCGAAAAAATACGGGGGGT
TCGACAGCCCGACGGTAGCGTACAGCGTACTAG
TAGTAGCGAAAGTAGAAAAAGGGAAAAGCAAA
AACTAAAAAGCGTAAAAGAACTACTAGGGAT
AACGATAATGGAACGAAGCAGCTTCGAAAAAA
ACCCGATAGACTTCCTAGAAGCGAAAGGGTACA
AAGAAGTAAAAAAGACCTAATAATAAACTA
CCGAAATACAGCCTATTCGAACTAGAAAACGGG
CGAAAACGAATGCTAGCGAGCGCGGGGGAAC
ACAAAAGGGAACGAACTAGCGCTACCGAGCA
AATACGTAACTTCCTATACCTAGCGAGCCACT

	<p>ACGAAAACTAAAAGGGAGCCCGGAAGACAAC GAACAAAAACAACCTATTCGTAGAACAACACAA ACACTACCTAGACGAAATAATAGAACAATAA GCGAATTCAGCAAACGAGTAATACTAGCGGACG CGAACCTAGACAAAGTACTAAGCGCGTACAACA AACACCGAGACAAACCGATACGAGAACAAGCG GAAAACATAATACACCTATTCACGCTAACGAAC CTAGGGGGCGCCGGCGGGCGTTCAAATACTTCGAC ACGACGATAGACCGAAAACGATACACGAGCAC GAAAGAAGTACTAGACGCGACGCTAATACACC AAAGCATAACGGGGCTATACGAAACGCGAATA GACCTAAGCCAACTAGGGGGGGACGGGGGGGG GAGCCCGAAAAAAAACGAAAAGTATGA</p>	
<p>Транскрипт Cas 9 с 5' UTR к HSD, ORF, соответствующая SEQ ID №: 254, последова тельность Kozak и 3' UTR к ALB</p>	<p>GGGTCCCGCAGTCGGCGTCCAGCGGCTCTGCTT GTTCGTGTGTGTGTCGTTGCAGGCCTTATTCGGA TCCGCCACCATGGACAAAAAATACAGCATAGGG CTAGACATAGGGACGAACAGCGTAGGGTGGGC GGTAATAACGGACGAATACAAAGTACCGAGCA AAAAATTCAAAGTACTAGGGAACACGGACCGA CACAGCATAAAAAAAAACCTAATAGGGGGCGCT ACTATTCGACAGCGGGGAAACGGCGGAAGCGA CGCGACTAAAACGAACGGCGCGACGACGATAC ACGCGACGAAAAACCGAATATGCTACCTACAA GAAATATTCAGCAACGAAATGGCGAAAGTAGA CGACAGCTTCTTCCACCGACTAGAAGAAAGCTT CCTAGTAGAAGAAGACAAAAAACACGAACGAC ACCCGATATTCGGGAACATAGTAGACGAAGTAG CGTACCACGAAAAATACCCGACGATATACCACC TACGAAAAAACTAGTAGACAGCACGGACAAA GCGGACCTACGACTAATATACCTAGCGCTAGCG CACATGATAAAATTCCGAGGGCACTTCCTAATA GAAGGGGACCTAAACCCGGACAACAGCGACGT AGACAAACTATTCATACTAGTACAAACGTA CAACCAACTATTCGAAGAAAACCCGATAAACGC GAGCGGGGTAGACGCGAAAGCGATACTAAGCG</p>	<p>255</p>

CGCGACTAAGCAAAAGCCGACGACTAGAAAAC
CTAATAGCGCAACTACCGGGGAAAAAAAAAA
CGGGCTATTCGGGAACCTAATAGCGCTAAGCCT
AGGGCTAACGCCGAACCTTCAAAGCAACTTCGA
CCTAGCGGAAGACGCGAAACTACAATAAGCA
AAGACACGTACGACGACGACCTAGACAACCTAC
TAGCGCAAATAGGGGACCAATACGCGGACCTAT
TCCTAGCGGCGAAAAACCTAAGCGACGCGATAC
TACTAAGCGACATACTACGAGTAAACACGGAAA
TAACGAAAGCGCCGCTAAGCGCGAGCATGATA
AAACGATACGACGAACACCACCAAGACCTAAC
GCTACTAAAAGCGCTAGTACGACAACAATACTACC
GGAAAAATACAAAGAAATATTCTTCGACCAAAG
CAAAAACGGGTACGCGGGGTACATAGACGGGG
GGGCGAGCCAAGAAGAATTCTACAAATTCATAA
AACCGATACTAGAAAAAATGGACGGGACGGAA
GAACTACTAGTAAAATAAACCAGAGAAGACCTA
CTACGAAAACAACGAACGTTTCGACAACGGGAG
CATACCGCACCAAATACACCTAGGGGAACTACA
CGCGATACTACGACGACAAGAAGACTTCTACCC
GTTCCCTAAAAGACAACCGAGAAAAAATAGAAA
AAATACTAACGTTCCGAATACCGTACTACGTAG
GGCCGCTAGCGCGAGGGAACAGCCGATTCGCGT
GGATGACGCGAAAAAGCGAAGAAACGATAACG
CCGTGGAACCTTCGAAGAAGTAGTAGACAAAGG
GGCGAGCGCGCAAAGCTTCATAGAACGAATGA
CGAACTTCGACAAAAACCTACCGAACGAAAAA
GTACTACCGAAACACAGCCTACTATACGAATAC
TTCACGGTATACAACGAACCTAACGAAAGTAAAA
TACGTAACGGAAGGGATGCGAAAACCGGCGTTC
CTAAGCGGGGAACAAAAAAGCGATAGTAGA
CCTACTATTCAAACGAACCGAAAAGTAACGGT
AAAACAATAAAAGAAGACTACTTCAAAAAA
TAGAATGCTTCGACAGCGTAGAAATAAGCGGGG
TAGAAGACCGATTCAACGCGAGCCTAGGGACGT

ACCACGACCTACTAAAAATAATAAAAGACAAA
GACTTCCTAGACAACGAAGAAAACGAAGACAT
ACTAGAAGACATAGTACTAACGCTAACGCTATT
CGAAGACCGAGAAATGATAGAAGAACGACTAA
AAACGTACGCGCACCTATTCGACGACAAAGTAA
TGAAACAACATAAAACGACGACGATACACGGGG
TGGGGGCGACTAAGCCGAAAATAATAACGG
GATACGAGACAAACAAAGCGGGAAAACGATAC
TAGACTTCCTAAAAAGCGACGGGTTCGCGAACC
GAACTTCATGCAACTAATACACGACGACAGCC
TAACGTTCAAAGAAGACATACAAAAAGCGCAA
GTAAGCGGGCAAGGGGACAGCCTACACGAACA
CATAGCGAACCTAGCGGGGAGCCCGGCGATAA
AAAAAGGGATACTACAAACGGTAAAAGTAGTA
GACGAAGTAGTAAAAGTAATGGGGCGACACAA
ACCGGAAAACATAGTAATAGAAATGGCGCGAG
AAAACCAAACGACGCAAAAAGGGCAAAAAAAC
AGCCGAGAACGAATGAAACGAATAGAAGAAGG
GATAAAAGAACTAGGGAGCCAAATACTAAAAG
AACACCCGGTAGAAAACACGCAACTACAAAAC
GAAAACTATACTATACTACCTACAAAACGGG
CGAGACATGTACGTAGACCAAGAACTAGACATA
AACCGACTAAGCGACTACGACGTAGACCACATA
GTACCGCAAAGCTTCCTAAAAGACGACAGCATA
GACAACAAAGTACTAACGCGAAGCGACAAAAA
CCGAGGGAAAAGCGACAACGTACCGAGCGAAG
AAGTAGTAAAAAAAATGAAAACTACTGGCGA
CAACTACTAAACGCGAACTAATAACGCAACGA
AAATTCGACAACCTAACGAAAGCGGAACGAGG
GGGGCTAAGCGAACTAGACAAAGCGGGGTTC
TAAAACGACAACCTAGTAGAAACGCGACAAATA
ACGAAACACGTAGCGCAAATACTAGACAGCCG
AATGAACACGAAATACGACGAAAACGACAAAC
TAATACGAGAAGTAAAAGTAATAACGCTAAAA
AGCAAACCTAGTAAGCGACTTCCGAAAAGACTTC

CAATTCTACAAAGTACGAGAAATAAACAACTAC
CACCACGCGCACGACGCGTACCTAAACGCGGTA
GTAGGGACGGCGCTAATAAAAAAATACCCGAA
ACTAGAAAGCGAATTCGTATACGGGGACTACAA
AGTATACGACGTACGAAAAATGATAGCGAAAA
GCGAACAAGAAATAGGGAAAGCGACGGCGAAA
TACTTCTTCTACAGCAACATAATGAACTTCTTCA
AAACGGAAATAACGCTAGCGAACGGGGAAATA
CGAAAACGACCGCTAATAGAAACGAACGGGGA
AACGGGGGAAATAGTATGGGACAAAGGGCGAG
ACTTCGCGACGGTACGAAAAGTACTAAGCATGC
CGCAAGTAAACATAGTAAAAAAAACGGAAGTA
CAAACGGGGGGGTTTCAGCAAAGAAAGCATACT
ACCGAAACGAAACAGCGACAACTAATAGCGC
GAAAAAAAGACTGGGACCCGAAAAAATACGGG
GGGTTTCGACAGCCCGACGGTAGCGTACAGCGTA
CTAGTAGTAGCGAAAGTAGAAAAAGGGAAAAG
CAAAAACTAAAAAGCGTAAAAAGAACTACTAG
GGATAACGATAATGGAACGAAGCAGCTTCGAA
AAAAACCCGATAGACTTCCTAGAAGCGAAAGG
GTACAAAGAAGTAAAAAAAGACCTAATAATAA
AACTACCGAAATACAGCCTATTCGAACTAGAAA
ACGGGCGAAAACGAATGCTAGCGAGCGCGGGG
GAACTACAAAAAGGGAACGAACTAGCGCTACC
GAGCAAATACGTAAACTTCCTATACCTAGCGAG
CCACTACGAAAACTAAAAGGGAGCCCGGAAG
ACAACGAACAAAAACAACCTATTCGTAGAACAA
CACAACACTACCTAGACGAAATAATAGAACA
AATAAGCGAATTCAGCAAACGAGTAATACTAGC
GGACGCGAACCTAGACAAAGTACTAAGCGCGT
ACAACAAACACCGAGACAAACCGATACGAGAA
CAAGCGGAAAACATAATACACCTATTCACGCTA
ACGAACCTAGGGGCGCCGGCGGCGTTCAAATAC
TTCGACACGACGATAGACCGAAAACGATACACG
AGCACGAAAGAAGTACTAGACGCGACGCTAAT

	<p>ACACCAAAGCATAACGGGGCTATACGAAACGC GAATAGACCTAAGCCAAGTAGGGGGGGACGGG GGGGGGAGCCCGAAAAAAAAAACGAAAAGTATG ACTAGCCATCACATTTAAAAGCATCTCAGCCTA CCATGAGAATAAGAGAAAAGAAAATGAAGATCA ATAGCTTATTCATCTCTTTTTCTTTTTCTGTTGGTG TAAAGCCAACACCCTGTCTAAAAAACATAAATT TCTTTAATCATTTTGCCTCTTTTCTCTGTGCTTCA ATTAATAAAAAATGGAAAGAACCTCGAG</p>	
<p>Транскрипт Cas 9 с первыми тремя нуклеотидами AGG для использования с CleanCap™, 5' UTR к HSD, ORF соответствующая SEQ ID №: 204, последовательность Kozak и 3' UTR к ALB</p>	<p>AGGTCCCGCAGTCGGCGTCCAGCGGCTCTGCTT GTTTCGTGTGTGTGTCGTTGCAGGCCTTATTCGGA TCCGCCACCATGGACAAGAAGTACAGCATCGGA CTGGACATCGGAACAAACAGCGTCGGATGGGC AGTCATCACAGACGAATACAAGGTCCCGAGCAA GAAGTTC AAGGTCCTGGGAAACACAGACAGAC ACAGCATCAAGAAGAACCTGATCGGAGCACTGC TGTTTCGACAGCGGAGAAACAGCAGAAGCAACA AGACTGAAGAGAACAGCAAGAAGAAGATACAC AAGAAGAAAGAACAGAATCTGCTACCTGCAGG AAATCTTCAGCAACGAAATGGCAAAGGTCGACG ACAGCTTCTTCCACAGACTGGAAGAAAGCTTCC TGGTTCGAAGAAGACAAGAAGCACGAAAGACAC CCGATCTTCGGAAACATCGTCGACGAAGTCGCA TACCACGAAAAGTACCCGACAATCTACCACCTG AGAAAGAAGCTGGTTCGACAGCACAGACAAGGC AGACCTGAGACTGATCTACCTGGCACTGGCACA CATGATCAAGTTCAGAGGACACTTCCTGATCGA AGGAGACCTGAACCCGGACAACAGCGACGTCG ACAAGCTGTTTCATCCAGCTGGTCCAGACATA ACCAGCTGTTTCGAAGAAAACCCGATCAACGCAA GCGGAGTCGACGCAAAGGCAATCCTGAGCGCA AGACTGAGCAAGAGCAGAAGACTGGAAAACCT GATCGCACAGCTGCCGGGAGAAAAGAAGAACG GACTGTTCGGAAACCTGATCGCACTGAGCCTGG GACTGACACCGAACTTCAAGAGCAACTTCGACC</p>	<p>256</p>

TGGCAGAAGACGCAAAGCTGCAGCTGAGCAAG
GACACATACGACGACGACCTGGACAACCTGCTG
GCACAGATCGGAGACCAGTACGCAGACCTGTTC
CTGGCAGCAAAGAACCTGAGCGACGCAATCCTG
CTGAGCGACATCCTGAGAGTCAACACAGAAATC
ACAAAGGCACCGCTGAGCGCAAGCATGATCAA
GAGATACGACGAACACCACCAGGACCTGACACT
GCTGAAGGCACTGGTCAGACAGCAGCTGCCGGA
AAAGTACAAGGAAATCTTCTTCGACCAGAGCAA
GAACGGATACGCAGGATACATCGACGGAGGAG
CAAGCCAGGAAGAATTCTACAAGTTCATCAAGC
CGATCCTGGAAAAGATGGACGGAACAGAAGAA
CTGCTGGTCAAGCTGAACAGAGAAGACCTGCTG
AGAAAGCAGAGAACATTCGACAACGGAAGCAT
CCCGCACCAAGATCCACCTGGGAGAACTGCACGC
AATCCTGAGAAGACAGGAAGACTTCTACCCGTT
CCTGAAGGACAACAGAGAAAAGATCGAAAAGA
TCCTGACATTCAGAATCCCGTACTACGTCGGAC
CGCTGGCAAGAGGAAACAGCAGATTCGCATGG
ATGACAAGAAAGAGCGAAGAAACAATCACACC
GTGGAACTTCGAAGAAGTCGTCGACAAGGGAG
CAAGCGCACAGAGCTTCATCGAAAGAATGACA
AACTTCGACAAGAACCTGCCGAACGAAAAGGTC
CTGCCGAAGCACAGCCTGCTGTACGAATACTTC
ACAGTCTACAACGAACTGACAAAGGTCAAGTAC
GTCACAGAAGGAATGAGAAAGCCGGCATTCTTG
AGCGGAGAACAGAAGAAGGCAATCGTCGACCT
GCTGTTCAAGACAAACAGAAAGGTCACAGTCAA
GCAGCTGAAGGAAGACTACTTCAAGAAGATCG
AATGCTTCGACAGCGTCGAAATCAGCGGAGTCG
AAGACAGATTCAACGCAAGCCTGGGAACATAACC
ACGACCTGCTGAAGATCATCAAGGACAAGGACT
TCCTGGACAACGAAGAAAACGAAGACATCCTG
GAAGACATCGTCCTGACACTGACACTGTTCGAA
GACAGAGAAATGATCGAAGAAAGACTGAAGAC

ATACGCACACCTGTTCGACGACAAGGTCATGAA
GCAGCTGAAGAGAAGAAGATACACAGGATGGG
GAAGACTGAGCAGAAAGCTGATCAACGGAATC
AGAGACAAGCAGAGCGGAAAGACAATCCTGGA
CTTCCTGAAGAGCGACGGATTCGCAAACAGAAA
CTTCATGCAGCTGATCCACGACGACAGCCTGAC
ATTCAAGGAAGACATCCAGAAGGCACAGGTCA
GCGGACAGGGAGACAGCCTGCACGAACACATC
GCAAACCTGGCAGGAAGCCCGGCAATCAAGAA
GGGAATCCTGCAGACAGTCAAGGTCGTCGACGA
ACTGGTCAAGGTCATGGGAAGACACAAGCCGG
AAAACATCGTCATCGAAATGGCAAGAGAAAAC
CAGACAACACAGAAGGGACAGAAGAACAGCAG
AGAAAGAATGAAGAGAATCGAAGAAGGAATCA
AGGAACTGGGAAGCCAGATCCTGAAGGAACAC
CCGGTCGAAAACACACAGCTGCAGAACGAAAA
GCTGTACCTGTACTACCTGCAGAACGGAAGAGA
CATGTACGTCGACCAGGAACTGGACATCAACAG
ACTGAGCGACTACGACGTCGACCACATCGTCCC
GCAGAGCTTCCTGAAGGACGACAGCATCGACAA
CAAGGTCCTGACAAGAAGCGACAAGAACAGAG
GAAAGAGCGACAACGTCCCGAGCGAAGAAGTC
GTCAAGAAGATGAAGAACTACTGGAGACAGCT
GCTGAACGCAAAGCTGATCACACAGAGAAAGTT
CGACAACCTGACAAAGGCAGAGAGAGGAGGAC
TGAGCGAACTGGACAAGGCAGGATTCATCAAG
AGACAGCTGGTCGAAACAAGACAGATCACAAA
GCACGTCGCACAGATCCTGGACAGCAGAATGAA
CACAAAGTACGACGAAAACGACAAGCTGATCA
GAGAAGTCAAGGTCATCACACTGAAGAGCAAG
CTGGTCAGCGACTTCAGAAAGGACTTCCAGTTC
TACAAGGTCAGAGAAATCAACAACCTACCACCAC
GCACACGACGCATACCTGAACGCAGTCGTCGGA
ACAGCACTGATCAAGAAGTACCCGAAGCTGGA
AAGCGAATTCGTCTACGGAGACTACAAGGTCTA

CGACGTCAGAAAGATGATCGCAAAGAGCGAAC
AGGAAATCGGAAAGGCAACAGCAAAGTACTTC
TTCTACAGCAACATCATGAACTTCTTCAAGACA
GAAATCACACTGGCAAACGGAGAAATCAGAAA
GAGACCGCTGATCGAAACAAACGGAGAAACAG
GAGAAATCGTCTGGGACAAGGGAAGAGACTTC
GCAACAGTCAGAAAGGTCCTGAGCATGCCGCAG
GTCAACATCGTCAAGAAGACAGAAGTCCAGAC
AGGAGGATTCAGCAAGGAAAGCATCCTGCCGA
AGAGAAACAGCGACAAGCTGATCGCAAGAAAG
AAGGACTGGGACCCGAAGAAGTACGGAGGATT
CGACAGCCCGACAGTCGCATACAGCGTCCTGGT
CGTCGCAAAGGTCGAAAAGGGAAAGAGCAAGA
AGCTGAAGAGCGTCAAGGAACTGCTGGGAATC
ACAATCATGGAAAGAAGCAGCTTCGAAAAGAA
CCCGATCGACTTCCTGGAAGCAAAGGGATACAA
GGAAGTCAAGAAGGACCTGATCATCAAGCTGCC
GAAGTACAGCCTGTTCGAACTGGAAAACGGAA
GAAAGAGAATGCTGGCAAGCGCAGGAGAACTG
CAGAAGGGAAACGAACTGGCACTGCCGAGCAA
GTACGTCAACTTCCTGTACCTGGCAAGCCACTA
CGAAAAGCTGAAGGGAAGCCCGGAAGACAACG
AACAGAAGCAGCTGTTCGTCGAACAGCACAAGC
ACTACCTGGACGAAATCATCGAACAGATCAGCG
AATTCAGCAAGAGAGTCATCCTGGCAGACGCAA
ACCTGGACAAGGTCCTGAGCGCATAACAAGC
ACAGAGACAAGCCGATCAGAGAACAGGCAGAA
AACATCATCCACCTGTTCACTGACAAACCTG
GGAGCACCGGCAGCATTCAAGTACTTCGACACA
ACAATCGACAGAAAGAGATACACAAGCACAAA
GGAAGTCCTGGACGCAAACTGATCCACCAGAG
CATCACAGGACTGTACGAAACAAGAATCGACCT
GAGCCAGCTGGGAGGAGACGGAGGAGGAAGCC
CGAAGAAGAAGAGAAAGGTCTAGCTAGCCATC
ACATTTAAAAGCATCTCAGCCTACCATGAGAAT

	<p>AAGAGAAAGAAAATGAAGATCAATAGCTTATTC ATCTCTTTTTCTTTTTTCGTTGGTGTAAGCCAAC ACCCTGTCTAAAAAACATAAATTTCTTTAATCAT TTTGCCTCTTTTCTCTGTGCTTCAATTAATAAAA AATGGAAAGAACCTCGAG</p>	
<p>Транскрипт Cas 9 с 5' UTR из CMV, ORF, соответствующая SEQ ID №: 204, последова тельность Козак и 3' UTR к ALB</p>	<p>GGGCAGATCGCCTGGAGACGCCATCCACGCTGT TTTGACCTCCATAGAAGACACCGGGACCGATCC AGCCTCCGCGGCCGGGAACGGTGCATTGGAACG CGGATTCCCCGTGCCAAGAGTGACTCACCGTCC TTGACACGGCCACCATGGACAAGAAGTACAGCA TCGGACTGGACATCGGAACAAACAGCGTCGGAT GGGCAGTCATCACAGACGAATACAAGGTCCCGA GCAAGAAGTTCAAGGTCCTGGGAAACACAGAC AGACACAGCATCAAGAAGAACCTGATCGGAGC ACTGCTGTTTCGACAGCGGAGAAACAGCAGAAG CAACAAGACTGAAGAGAACAGCAAGAAGAAGA TACACAAGAAGAAAGAACAGAATCTGCTACCTG CAGGAAATCTTCAGCAACGAAATGGCAAAGGTC GACGACAGCTTCTTCCACAGACTGGAAGAAAGC TTCCTGGTCGAAGAAGACAAGAAGCACGAAAG ACACCCGATCTTCGGAAACATCGTCGACGAAGT CGCATAACCACGAAAAGTACCCGACAATCTACCA CCTGAGAAAGAAGCTGGTCGACAGCACAGACA AGGCAGACCTGAGACTGATCTACCTGGCACTGG CACACATGATCAAGTTCAGAGGACACTTCCTGA TCGAAGGAGACCTGAACCCGGACAACAGCGAC GTCGACAAGCTGTTCATCCAGCTGGTCCAGACA TACAACCAGCTGTTCGAAGAAAACCCGATCAAC GCAAGCGGAGTCGACGCAAAGGCAATCCTGAG CGCAAGACTGAGCAAGAGCAGAAGACTGGAAA ACCTGATCGCACAGCTGCCGGGAGAAAAGAAG AACGGACTGTTCGGAAACCTGATCGCACTGAGC CTGGGACTGACACCGAACTTCAAGAGCAACTTC GACCTGGCAGAAGACGCAAAGCTGCAGCTGAG CAAGGACACATACGACGACGACCTGGACAACCT</p>	<p>257</p>

GCTGGCACAGATCGGAGACCAGTACGCAGACCT
GTTCTGAGCAGCAAAGAACCTGAGCGACGCAAT
CCTGCTGAGCGACATCCTGAGAGTCAACACAGA
AATCACAAAGGCACCGCTGAGCGCAAGCATGAT
CAAGAGATACGACGAACACCACCAGGACCTGA
CACTGCTGAAGGCACTGGTCAGACAGCAGCTGC
CGGAAAAGTACAAGGAAATCTTCTTCGACCAGA
GCAAGAACGGATACGCAGGATACATCGACGGA
GGAGCAAGCCAGGAAGAATTCTACAAGTTCATC
AAGCCGATCCTGGAAAAGATGGACGGAACAGA
AGAACTGCTGGTCAAGCTGAACAGAGAAGACCT
GCTGAGAAAGCAGAGAACATTCGACAACGGAA
GCATCCCGCACCAGATCCACCTGGGAGAACTGC
ACGCAATCCTGAGAAGACAGGAAGACTTCTACC
CGTTCCTGAAGGACAACAGAGAAAAGATCGAA
AAGATCCTGACATTCAGAATCCCGTACTACGTC
GGACCGCTGGCAAGAGGAAACAGCAGATTTCGC
ATGGATGACAAGAAAGAGCGAAGAAACAATCA
CACCGTGGAACCTCGAAGAAGTCGTCGACAAGG
GAGCAAGCGCACAGAGCTTCATCGAAAGAATG
ACAAACTTCGACAAGAACCTGCCGAACGAAAA
GGTCCTGCCGAAGCACAGCCTGCTGTACGAATA
CTTCACAGTCTACAACGAACTGACAAAGGTCAA
GTACGTCACAGAAGGAATGAGAAAGCCGGCAT
TCCTGAGCGGAGAACAGAAGAAGGCAATCGTC
GACCTGCTGTTCAAGACAAACAGAAAGGTCACA
GTCAAGCAGCTGAAGGAAGACTACTTCAAGAA
GATCGAATGCTTCGACAGCGTCGAAATCAGCGG
AGTCGAAGACAGATTCAACGCAAGCCTGGGAA
CATAACCAGACCTGCTGAAGATCATCAAGGACA
AGGACTTCCTGGACAACGAAGAAAACGAAGAC
ATCCTGGAAGACATCGTCCTGACACTGACACTG
TTCGAAGACAGAGAAATGATCGAAGAAAGACT
GAAGACATACGCACACCTGTTCGACGACAAGGT
CATGAAGCAGCTGAAGAGAAGAAGATACACAG

GATGGGGAAGACTGAGCAGAAAGCTGATCAAC
GGAATCAGAGACAAGCAGAGCGGAAAGACAAT
CCTGGACTTCCTGAAGAGCGACGGATTCGCAA
CAGAAACTTCATGCAGCTGATCCACGACGACAG
CCTGACATTCAAGGAAGACATCCAGAAGGCACA
GGTCAGCGGACAGGGAGACAGCCTGCACGAAC
ACATCGCAAACCTGGCAGGAAGCCCGGCAATCA
AGAAGGGAATCCTGCAGACAGTCAAGGTCGTCTG
ACGAACTGGTCAAGGTCATGGGAAGACACAAG
CCGGAAAACATCGTCATCGAAATGGCAAGAGA
AAACCAGACAACACAGAAGGGACAGAAGAACA
GCAGAGAAAGAATGAAGAGAATCGAAGAAGGA
ATCAAGGAACTGGGAAGCCAGATCCTGAAGGA
ACACCCGGTCGAAAACACACAGCTGCAGAACG
AAAAGCTGTACCTGTACTACCTGCAGAACGGAA
GAGACATGTACGTCGACCAGGAACTGGACATCA
ACAGACTGAGCGACTACGACGTCGACCACATCG
TCCCGCAGAGCTTCCTGAAGGACGACAGCATCG
ACAACAAGGTCCTGACAAGAAGCGACAAGAAC
AGAGGAAAGAGCGACAACGTCCCGAGCGAAGA
AGTCGTCAAGAAGATGAAGAACTACTGGAGAC
AGCTGCTGAACGCAAAGCTGATCACACAGAGA
AAGTTCGACAACCTGACAAAGGCAGAGAGAGG
AGGACTGAGCGAACTGGACAAGGCAGGATTCA
TCAAGAGACAGCTGGTCGAAACAAGACAGATC
ACAAAGCACGTCGCACAGATCCTGGACAGCAG
AATGAACACAAAGTACGACGAAAACGACAAGC
TGATCAGAGAAGTCAAGGTCATCACACTGAAGA
GCAAGCTGGTCAGCGACTTCAGAAAGGACTTCC
AGTTCTACAAGGTCAGAGAAATCAACA ACTACC
ACCACGCACACGACGCATACCTGAACGCAGTCG
TCGGAACAGCACTGATCAAGAAGTACCCGAAGC
TGGAAAGCGAATTCGTCTACGGAGACTACAAGG
TCTACGACGTCAGAAAGATGATCGCAAAGAGCG
AACAGGAAATCGGAAAGGCAACAGCAAAGTAC

TTCTTCTACAGCAACATCATGAACTTCTTCAAGA
CAGAAATCACACTGGCAAACGGAGAAATCAGA
AAGAGACCGCTGATCGAAACAAACGGAGAAAC
AGGAGAAATCGTCTGGGACAAGGGAAGAGACT
TCGCAACAGTCAGAAAGGTCCTGAGCATGCCGC
AGGTCAACATCGTCAAGAAGACAGAAGTCCAG
ACAGGAGGATTCAGCAAGGAAAGCATCCTGCC
GAAGAGAAACAGCGACAAGCTGATCGCAAGAA
AGAAGGACTGGGACCCGAAGAAGTACGGAGGA
TTCGACAGCCCGACAGTCGCATACAGCGTCCTG
GTCGTGCGCAAAGGTCGAAAAGGGAAAGAGCAA
GAAGCTGAAGAGCGTCAAGGAACTGCTGGGAA
TCACAATCATGGAAAGAAGCAGCTTCGAAAAG
AACCCGATCGACTTCCTGGAAGCAAAGGGATAC
AAGGAAGTCAAGAAGGACCTGATCATCAAGCT
GCCGAAGTACAGCCTGTTTCGAACTGGAAAACGG
AAGAAAGAGAATGCTGGCAAGCGCAGGAGAAC
TGCAGAAGGGAAACGAACTGGCACTGCCGAGC
AAGTACGTCAACTTCCTGTACCTGGCAAGCCAC
TACGAAAAGCTGAAGGGAAGCCCGAAGACAA
CGAACAGAAGCAGCTGTTTCGTCGAACAGCACAA
GCACTACCTGGACGAAATCATCGAACAGATCAG
CGAATTCAGCAAGAGAGTCATCCTGGCAGACGC
AAACCTGGACAAGGTCCTGAGCGCATAACAACAA
GCACAGAGACAAGCCGATCAGAGAACAGGCAG
AAAACATCATCCACCTGTTTCACACTGACAAACC
TGGGAGCACCGGCAGCATTCAAGTACTTCGACA
CAACAATCGACAGAAAGAGATACACAAGCACA
AAGGAAGTCCTGGACGCAAACTGATCCACCAG
AGCATCACAGGACTGTACGAAACAAGAATCGA
CCTGAGCCAGCTGGGAGGAGACGGAGGAGGAA
GCCCCAAGAAGAAGAGAAAGGTCTAGCTAGCC
ATCACATTTAAAAGCATCTCAGCCTACCATGAG
AATAAGAGAAAGAAAATGAAGATCAATAGCTT
ATTCATCTCTTTTTCTTTTTTCGTTGGTGTAAGCC

	AACACCCTGTCTAAAAAACATAAATTTCTTTAA TCATTTTGCCTCTTTTCTCTGTGCTTCAATTAATA AAAAATGGAAAGAACCTCGAG	
<p>Транскрипт Cas 9 с 5' UTR из HBB, ORF, соответствующая SEQ ID №: 204, последовательность Kozak и 3' UTR к HBB</p>	GGGACATTTGCTTCTGACACAACTGTGTTCACTA GCAACCTCAAACAGACACCGGATCTGCCACCAT GGACAAGAAGTACAGCATCGGACTGGACATCG GAACAAACAGCGTCGGATGGGCAGTCATCACA GACGAATACAAGGTCCCGAGCAAGAAGTTCAA GGTCCTGGGAAACACAGACAGACACAGCATCA AGAAGAACCTGATCGGAGCACTGCTGTTTCGACA GCGGAGAAACAGCAGAAGCAACAAGACTGAAG AGAACAGCAAGAAGAAGATACACAAGAAGAAA GAACAGAATCTGCTACCTGCAGGAAATCTTCAG CAACGAAATGGCAAAGGTCGACGACAGCTTCTT CCACAGACTGGAAGAAAGCTTCCTGGTTCGAAGA AGACAAGAAGCACGAAAGACACCCGATCTTCG GAAACATCGTCGACGAAGTCGCATACCACGAAA AGTACCCGACAATCTACCACCTGAGAAAGAAGC TGGTCGACAGCACAGACAAGGCAGACCTGAGA CTGATCTACCTGGCACTGGCACACATGATCAAG TTCAGAGGACACTTCCTGATCGAAGGAGACCTG AACCCGGACAACAGCGACGTCGACAAGCTGTTC ATCCAGCTGGTCCAGACATAACAACCAGCTGTTC GAAGAAAACCCGATCAACGCAAGCGGAGTCGA CGCAAAGGCAATCCTGAGCGCAAGACTGAGCA AGAGCAGAAGACTGGAAAACCTGATCGCACAG CTGCCGGGAGAAAAGAAGAACGGACTGTTCCGG AAACCTGATCGCACTGAGCCTGGGACTGACACC GAACTTCAAGAGCAACTTCGACCTGGCAGAAGA CGCAAAGCTGCAGCTGAGCAAGGACACATACG ACGACGACCTGGACAACCTGCTGGCACAGATCG GAGACCAGTACGCAGACCTGTTCTTGGCAGCAA AGAACCTGAGCGACGCAATCCTGCTGAGCGACA TCCTGAGAGTCAACACAGAAATCACAAAGGCAC CGCTGAGCGCAAGCATGATCAAGAGATACGAC	258

GAACACCACCAGGACCTGACACTGCTGAAGGCA
CTGGTCAGACAGCAGCTGCCGGAAAAGTACAA
GGAAATCTTCTTCGACCAGAGCAAGAACGGATA
CGCAGGATACATCGACGGAGGAGCAAGCCAGG
AAGAATTCTACAAGTTCATCAAGCCGATCCTGG
AAAAGATGGACGGAACAGAAGAACTGCTGGTC
AAGCTGAACAGAGAAGACCTGCTGAGAAAGCA
GAGAACATTCGACAACGGAAGCATCCCGCACCA
GATCCACCTGGGAGAACTGCACGCAATCCTGAG
AAGACAGGAAGACTTCTACCCGTTCTGAAGGA
CAACAGAGAAAAGATCGAAAAGATCCTGACAT
TCAGAATCCCGTACTACGTCGGACCGCTGGCAA
GAGGAAACAGCAGATTCGCATGGATGACAAGA
AAGAGCGAAGAAACAATCACACCGTGGA ACTT
CGAAGAAGTCGTGACAAGGGAGCAAGCGCAC
AGAGCTTCATCGAAAGAATGACAACTTCGACA
AGAACCTGCCGAACGAAAAGGTCCTGCCGAAG
CACAGCCTGCTGTACGAATACTTCACAGTCTAC
AACGAACTGACAAAGGTCAAGTACGTCACAGA
AGGAATGAGAAAGCCGGCATTCTGAGCGGAG
AACAGAAGAAGGCAATCGTCGACCTGCTGTTCA
AGACAAACAGAAAGGTCACAGTCAAGCAGCTG
AAGGAAGACTACTTCAAGAAGATCGAATGCTTC
GACAGCGTCGAAATCAGCGGAGTCGAAGACAG
ATTCAACGCAAGCCTGGGAACATAACCACGACCT
GCTGAAGATCATCAAGGACAAGGACTTCCTGGA
CAACGAAGAAAACGAAGACATCCTGGAAGACA
TCGTCCTGACACTGACACTGTTCTGAAGACAGAG
AAATGATCGAAGAAAGACTGAAGACATACGCA
CACCTGTTCTGACGACAAGGTCATGAAGCAGCTG
AAGAGAAGAAGATACACAGGATGGGGAAGACT
GAGCAGAAAGCTGATCAACGGAATCAGAGACA
AGCAGAGCGGAAAGACAATCCTGGACTTCCTGA
AGAGCGACGGATTCGCAAACAGAACTTCATGC
AGCTGATCCACGACGACAGCCTGACATTCAAGG

AAGACATCCAGAAGGCACAGGTCAGCGGACAG
GGAGACAGCCTGCACGAACACATCGCAAACCTG
GCAGGAAGCCCGGCAATCAAGAAGGGAATCCT
GCAGACAGTCAAGGTCGTGACGAACTGGTCAA
GGTCATGGGAAGACACAAGCCGGAAAACATCG
TCATCGAAATGGCAAGAGAAAACCAGACAACA
CAGAAGGGACAGAAGAACAGCAGAGAAAGAAT
GAAGAGAATCGAAGAAGGAATCAAGGAACTGG
GAAGCCAGATCCTGAAGGAACACCCGGTCGAA
AACACACAGCTGCAGAACGAAAAGCTGTACCTG
TACTACCTGCAGAACGGAAGAGACATGTACGTC
GACCAGGAACTGGACATCAACAGACTGAGCGA
CTACGACGTCGACCACATCGTCCCGCAGAGCTT
CCTGAAGGACGACAGCATCGACAACAAGGTCCT
GACAAGAAGCGACAAGAACAGAGGAAAGAGCG
ACAACGTCCCGAGCGAAGAAGTCGTCAAGAAG
ATGAAGAACTACTGGAGACAGCTGCTGAACGCA
AAGCTGATCACACAGAGAAAGTTCGACAACCTG
ACAAAGGCAGAGAGAGGAGGACTGAGCGAACT
GGACAAGGCAGGATTCATCAAGAGACAGCTGG
TCGAAACAAGACAGATCACAAAGCACGTCGCA
CAGATCCTGGACAGCAGAATGAACACAAAGTA
CGACGAAAACGACAAGCTGATCAGAGAAGTCA
AGGTCATCACACTGAAGAGCAAGCTGGTCAGCG
ACTTCAGAAAGGACTTCCAGTTCTACAAGGTCA
GAGAAATCAACA ACTACCACCACGCACACGAC
GCATACCTGAACGCAGTCGTGGAACAGCACTG
ATCAAGAAGTACCCGAAGCTGGAAAGCGAATTC
GTCTACGGAGACTACAAGGTCTACGACGTCAGA
AAGATGATCGCAAAGAGCGAACAGGAAATCGG
AAAGGCAACAGCAAAGTACTTCTTCTACAGCAA
CATCATGAACTTCTTCAAGACAGAAATCACACT
GGCAAACGGAGAAATCAGAAAGAGACCGCTGA
TCGAAACAAACGGAGAAACAGGAGAAATCGTC
TGGGACAAGGGAAGAGACTTCGCAACAGTCAG

	AAAGGTCCTGAGCATGCCGCAGGTCAACATCGT CAAGAAGACAGAAGTCCAGACAGGAGGATTCA GCAAGGAAAGCATCCTGCCGAAGAGAAACAGC GACAAGCTGATCGCAAGAAAGAAGGACTGGGA CCCGAAGAAGTACGGAGGATTCGACAGCCCGA CAGTCGCATACAGCGTCCTGGTCGTCGCAAAGG TCGAAAAGGGAAAGAGCAAGAAGCTGAAGAGC GTCAAGGAACTGCTGGGAATCACAATCATGGAA AGAAGCAGCTTCGAAAAGAACCCGATCGACTTC CTGGAAGCAAAGGGATACAAGGAAGTCAAGAA GGACCTGATCATCAAGCTGCCGAAGTACAGCCT GTTCGAACTGGAAAACGGAAGAAAGAGAATGC TGGCAAGCGCAGGAGAACTGCAGAAGGGAAAC GAACTGGCACTGCCGAGCAAGTACGTCAACTTC CTGTACCTGGCAAGCCACTACGAAAAGCTGAAG GGAAGCCCGGAAGACAACGAACAGAAGCAGCT GTTCGTCGAACAGCACAAGCACTACCTGGACGA AATCATCGAACAGATCAGCGAATTCAGCAAGAG AGTCATCCTGGCAGACGCAAACCTGGACAAGGT CCTGAGCGCATAACAAGCACAGAGACAAGC CGATCAGAGAACAGGCAGAAAACATCATCCAC CTGTTCACACTGACAAACCTGGGAGCACCGGCA GCATTCAAGTACTTCGACACAACAATCGACAGA AAGAGATACACAAGCACAAAGGAAGTCCTGGA CGCAACACTGATCCACCAGAGCATCACAGGACT GTACGAAACAAGAATCGACCTGAGCCAGCTGG GAGGAGACGGAGGAGGAAGCCCGAAGAAGAAG AGAAAGGTCTAGCTAGCGCTCGCTTTCTTGCTGT CCAATTTCTATTAAGGTTCTTTGTTCCCTAAG TCCAACTACTAACTGGGGGATATTATGAAGGG CCTTGAGCATCTGGATTCTGCCTAATAAAAAAC ATTTATTTTCATTGCCTCGAG	
Транскрипт Cas 9 с 5' UTR из XBG, ORF, соответствующая SEQ	GGGAAGCTCAGAATAAACGCTCAACTTTGGCCG GATCTGCCACCATGGACAAGAAGTACAGCATCG GACTGGACATCGGAACAAACAGCGTCGGATGG	259

ID №: 204, последовательность Kozak и 3' UTR к XBG	GCAGTCATCACAGACGAATACAAGGTCCCGAGC AAGAAGTTCAAGGTCCTGGGAAACACAGACAG ACACAGCATCAAGAAGAACCTGATCGGAGCACT GCTGTTTCGACAGCGGAGAAACAGCAGAAGCAA CAAGACTGAAGAGAACAGCAAGAAGAAGATAC ACAAGAAGAAAGAACAGAATCTGCTACCTGCA GGAAATCTTCAGCAACGAAATGGCAAAGGTCG ACGACAGCTTCTTCCACAGACTGGAAGAAAGCT TCCTGGTTCGAAGAAGACAAGAAGCACGAAAGA CACCCGATCTTCGGAAACATCGTCGACGAAGTC GCATACCACGAAAAGTACCCGACAATCTACCAC CTGAGAAAGAAGCTGGTCGACAGCACAGACAA GGCAGACCTGAGACTGATCTACCTGGCACTGGC ACACATGATCAAGTTCAGAGGACACTTCCTGAT CGAAGGAGACCTGAACCCGGACAACAGCGACG TCGACAAGCTGTTTCATCCAGCTGGTCCAGACAT ACAACCAGCTGTTTCGAAGAAAACCCGATCAACG CAAGCGGAGTCGACGCAAAGGCAATCCTGAGC GCAAGACTGAGCAAGAGCAGAAGACTGGAAAA CCTGATCGCACAGCTGCCGGGAGAAAAGAAGA ACGGACTGTTTCGGAAACCTGATCGCACTGAGCC TGGGACTGACACCGAACTTCAAGAGCAACTTCG ACCTGGCAGAAGACGCAAAGCTGCAGCTGAGC AAGGACACATACGACGACGACCTGGACAACCT GCTGGCACAGATCGGAGACCAGTACGCAGACCT GTTCTTGGCAGCAAAGAACCTGAGCGACGCAAT CCTGCTGAGCGACATCCTGAGAGTCAACACAGA AATCACAAAGGCACCGCTGAGCGCAAGCATGAT CAAGAGATACGACGAACACCACCAGGACCTGA CACTGCTGAAGGCACTGGTCAGACAGCAGCTGC CGGAAAAGTACAAGGAAATCTTCTTCGACCAGA GCAAGAACGGATACGCAGGATACATCGACGGA GGAGCAAGCCAGGAAGAATTCTACAAGTTCATC AAGCCGATCCTGGAAAAGATGGACGGAACAGA AGAACTGCTGGTCAAGCTGAACAGAGAAGACCT
--	--

GCTGAGAAAGCAGAGAACATTCGACAACGGAA
GCATCCCGCACCAGATCCACCTGGGAGAACTGC
ACGCAATCCTGAGAAGACAGGAAGACTTCTACC
CGTTCCTGAAGGACAACAGAGAAAAGATCGAA
AAGATCCTGACATTCAGAATCCCGTACTACGTC
GGACCGCTGGCAAGAGGAAACAGCAGATTTCGC
ATGGATGACAAGAAAGAGCGAAGAAACAATCA
CACCGTGGAACCTCGAAGAAGTCGTCGACAAGG
GAGCAAGCGCACAGAGCTTCATCGAAAGAATG
ACAAACTTCGACAAGAACCTGCCGAACGAAAA
GGTCCTGCCGAAGCACAGCCTGCTGTACGAATA
CTTCACAGTCTACAACGAACTGACAAAGGTCAA
GTACGTCACAGAAGGAATGAGAAAGCCGGCAT
TCCTGAGCGGAGAACAGAAGAAGGCAATCGTC
GACCTGCTGTTCAAGACAAACAGAAAGGTCACA
GTCAAGCAGCTGAAGGAAGACTACTTCAAGAA
GATCGAATGCTTCGACAGCGTCGAAATCAGCGG
AGTCGAAGACAGATTCAACGCAAGCCTGGGAA
CATAACCAGACCTGCTGAAGATCATCAAGGACA
AGGACTTCCTGGACAACGAAGAAAACGAAGAC
ATCCTGGAAGACATCGTCCTGACACTGACACTG
TTCGAAGACAGAGAAATGATCGAAGAAAGACT
GAAGACATACGCACACCTGTTCGACGACAAGGT
CATGAAGCAGCTGAAGAGAAGAAGATACACAG
GATGGGGAAGACTGAGCAGAAAGCTGATCAAC
GGAATCAGAGACAAGCAGAGCGGAAAGACAAT
CCTGGACTTCCTGAAGAGCGACGGATTCGCAA
CAGAACTTCATGCAGCTGATCCACGACGACAG
CCTGACATTCAAGGAAGACATCCAGAAGGCACA
GGTCAGCGGACAGGGAGACAGCCTGCACGAAC
ACATCGCAAACCTGGCAGGAAGCCCGGCAATCA
AGAAGGGAATCCTGCAGACAGTCAAGGTCTGTCG
ACGAACTGGTCAAGGTCATGGGAAGACACAAG
CCGGAAAACATCGTCATCGAAATGGCAAGAGA
AAACCAGACAACACAGAAGGGACAGAAGAACA

GCAGAGAAAGAATGAAGAGAATCGAAGAAGGA
ATCAAGGAACTGGGAAGCCAGATCCTGAAGGA
ACACCCGGTCGAAAACACACAGCTGCAGAACG
AAAAGCTGTACCTGTACTACCTGCAGAACGGAA
GAGACATGTACGTCGACCAGGAACTGGACATCA
ACAGACTGAGCGACTACGACGTCGACCACATCG
TCCCGCAGAGCTTCCTGAAGGACGACAGCATCG
ACAACAAGGTCCTGACAAGAAGCGACAAGAAC
AGAGGAAAGAGCGACAACGTCCCGAGCGAAGA
AGTCGTCAAGAAGATGAAGA ACTACTGGAGAC
AGCTGCTGAACGCAAAGCTGATCACACAGAGA
AAGTTCGACAACCTGACAAAGGCAGAGAGAGG
AGGACTGAGCGAACTGGACAAGGCAGGATTCA
TCAAGAGACAGCTGGTCGAAACAAGACAGATC
ACAAAGCACGTGCGCACAGATCCTGGACAGCAG
AATGAACACAAAGTACGACGAAAACGACAAGC
TGATCAGAGAAGTCAAGGTCATCACACTGAAGA
GCAAGCTGGTCAGCGACTTCAGAAAGGACTTCC
AGTTCTACAAGGTCAGAGAAATCAACA ACTACC
ACCACGCACACGACGCATACCTGAACGCAGTCG
TCGGAACAGCACTGATCAAGAAGTACCCGAAGC
TGGAAAGCGAATTCGTCTACGGAGACTACAAGG
TCTACGACGTCAGAAAGATGATCGCAAAGAGCG
AACAGGAAATCGGAAAGGCAACAGCAAAGTAC
TTCTTCTACAGCAACATCATGAACTTCTTCAAGA
CAGAAATCACACTGGCAAACGGAGAAATCAGA
AAGAGACCGCTGATCGAAACAAACGGAGAAAC
AGGAGAAATCGTCTGGGACAAGGGAAGAGACT
TCGCAACAGTCAGAAAGGTCCTGAGCATGCCGC
AGGTCAACATCGTCAAGAAGACAGAAGTCCAG
ACAGGAGGATTCAGCAAGGAAAGCATCCTGCC
GAAGAGAAACAGCGACAAGCTGATCGCAAGAA
AGAAGGACTGGGACCCGAAGAAGTACGGAGGA
TTCGACAGCCCGACAGTCGCATACAGCGTCCTG
GTCGTCGCAAAGGTCGAAAAGGGAAAGAGCAA

		<p>GAAGCTGAAGAGCGTCAAGGAACTGCTGGGAA TCACAATCATGGAAAGAAGCAGCTTCGAAAAG AACCCGATCGACTTCCTGGAAGCAAAGGGATAC AAGGAAGTCAAGAAGGACCTGATCATCAAGCT GCCGAAGTACAGCCTGTTCGAACTGGAAAACGG AAGAAAGAGAATGCTGGCAAGCGCAGGAGAAC TGCAGAAGGGAAACGAACTGGCACTGCCGAGC AAGTACGTCAACTTCCTGTACCTGGCAAGCCAC TACGAAAAGCTGAAGGGAAGCCCGGAAGACAA CGAACAGAAGCAGCTGTTCGTGCAACAGCACAA GCACTACCTGGACGAAATCATCGAACAGATCAG CGAATTCAGCAAGAGAGTCATCCTGGCAGACGC AAACCTGGACAAGGTCCTGAGCGCATAACAACAA GCACAGAGACAAGCCGATCAGAGAACAGGCAG AAAACATCATCCACCTGTTCCACTGACAAACC TGGGAGCACCGGCAGCATTCAAGTACTTCGACA CAACAATCGACAGAAAGAGATACACAAGCACA AAGGAAGTCCTGGACGCAACACTGATCCACCAG AGCATCACAGGACTGTACGAAACAAGAATCGA CCTGAGCCAGCTGGGAGGAGACGGAGGAGGAA GCCCCAAGAAGAAGAGAAAGGTCTAGCTAGCA CCAGCCTCAAGAACACCCGAATGGAGTCTCTAA GCTACATAATACCAACTTACACTTTACAAAATG TTGTCCCCCAAATGTAGCCATTCGTATCTGCTC CTAATAAAAAGAAAGTTTCTTCACATTCTCTCG AG</p>	
<p>Транскрипт Cas 9 с первыми тремя нуклеотидами AGG для использования с CleanCap™, 5' UTR из XBG, ORF соответствующая SEQ ID №: 204, последовательность</p>	<p>AGGAAGCTCAGAATAAACGCTCAACTTTGGCCG GATCTGCCACCATGGACAAGAAGTACAGCATCG GACTGGACATCGGAACAAACAGCGTCGGATGG GCAGTCATCACAGACGAATACAAGGTCCCGAGC AAGAAGTTCAAGGTCCTGGGAAACACAGACAG ACACAGCATCAAGAAGAACCTGATCGGAGCACT GCTGTTCGACAGCGGAGAAACAGCAGAAGCAA CAAGACTGAAGAGAACAGCAAGAAGAAGATAC ACAAGAAGAAAGAACAGAATCTGCTACCTGCA</p>	260	

Kozak и 3' UTR к XBG

GGAAATCTTCAGCAACGAAATGGCAAAGGTCG
ACGACAGCTTCTTCCACAGACTGGAAGAAAGCT
TCCTGGTTCGAAGAAGACAAGAAGCACGAAAGA
CACCCGATCTTCGGAAACATCGTCGACGAAGTC
GCATACCACGAAAAGTACCCGACAATCTACCAC
CTGAGAAAGAAGCTGGTCGACAGCACAGACAA
GGCAGACCTGAGACTGATCTACCTGGCACTGGC
ACACATGATCAAGTTCAGAGGACACTTCCTGAT
CGAAGGAGACCTGAACCCGGACAACAGCGACG
TCGACAAGCTGTTCATCCAGCTGGTCCAGACAT
ACAACCAGCTGTTCGAAGAAAACCCGATCAACG
CAAGCGGAGTCGACGCAAAGGCAATCCTGAGC
GCAAGACTGAGCAAGAGCAGAAGACTGGAAAA
CCTGATCGCACAGCTGCCGGGAGAAAAGAAGA
ACGGACTGTTCGGAAACCTGATCGCACTGAGCC
TGGGACTGACACCGAACTTCAAGAGCAACTTCG
ACCTGGCAGAAGACGCAAAGCTGCAGCTGAGC
AAGGACACATACGACGACGACCTGGACAACCT
GCTGGCACAGATCGGAGACCAGTACGCAGACCT
GTTCTTGGCAGCAAAGAACCTGAGCGACGCAAT
CCTGCTGAGCGACATCCTGAGAGTCAACACAGA
AATCACAAAGGCACCGCTGAGCGCAAGCATGAT
CAAGAGATACGACGAACACCACCAGGACCTGA
CACTGCTGAAGGCACTGGTCAGACAGCAGCTGC
CGGAAAAGTACAAGGAAATCTTCTTCGACCAGA
GCAAGAACGGATACGCAGGATACATCGACGGA
GGAGCAAGCCAGGAAGAATTCTACAAGTTCATC
AAGCCGATCCTGGAAAAGATGGACGGAACAGA
AGAACTGCTGGTCAAGCTGAACAGAGAAGACCT
GCTGAGAAAGCAGAGAACATTCGACAACGGAA
GCATCCCGCACCAAGATCCACCTGGGAGAACTGC
ACGCAATCCTGAGAAGACAGGAAGACTTCTACC
CGTTCCTGAAGGACAACAGAGAAAAGATCGAA
AAGATCCTGACATTCAGAATCCCGTACTACGTC
GGACCGCTGGCAAGAGGAAACAGCAGATTCGC

ATGGATGACAAGAAAGAGCGAAGAAACAATCA
CACCGTGGAAC TTCGAAGAAGTCGTCGACAAGG
GAGCAAGCGCACAGAGCTTCATCGAAAGAATG
ACAAACTTCGACAAGAACCTGCCGAACGAAAA
GGTCCTGCCGAAGCACAGCCTGCTGTACGAATA
CTTCACAGTCTACAACGAACTGACAAAGGTCAA
GTACGTCACAGAAGGAATGAGAAAGCCGGCAT
TCCTGAGCGGAGAACAGAAGAAGGCAATCGTC
GACCTGCTGTTCAAGACAAACAGAAAGGTCACA
GTCAAGCAGCTGAAGGAAGACTACTTCAAGAA
GATCGAATGCTTCGACAGCGTCGAAATCAGCGG
AGTCGAAGACAGATTCAACGCAAGCCTGGGAA
CATAACCAGACCTGCTGAAGATCATCAAGGACA
AGGACTTCCTGGACAACGAAGAAAACGAAGAC
ATCCTGGAAGACATCGTCCTGACACTGACACTG
TTCGAAGACAGAGAAATGATCGAAGAAAGACT
GAAGACATACGCACACCTGTTTCGACGACAAGGT
CATGAAGCAGCTGAAGAGAAGAAGATACACAG
GATGGGGAAGACTGAGCAGAAAGCTGATCAAC
GGAATCAGAGACAAGCAGAGCGGAAAGACAAT
CCTGGACTTCCTGAAGAGCGACGGATTCGCAA
CAGAAACTTCATGCAGCTGATCCACGACGACAG
CCTGACATTCAAGGAAGACATCCAGAAGGCACA
GGTCAGCGGACAGGGAGACAGCCTGCACGAAC
ACATCGCAAACCTGGCAGGAAGCCCGGCAATCA
AGAAGGGAATCCTGCAGACAGTCAAGGTCGTCG
ACGAACTGGTCAAGGTCATGGGAAGACACAAG
CCGGAACATCGTCATCGAAATGGCAAGAGA
AAACCAGACAACACAGAAGGGACAGAAGAACA
GCAGAGAAAGAATGAAGAGAATCGAAGAAGGA
ATCAAGGAACTGGGAAGCCAGATCCTGAAGGA
ACACCCGGTCGAAAACACACAGCTGCAGAACG
AAAAGCTGTACCTGTACTACCTGCAGAACGGAA
GAGACATGTACGTCGACCAGGAACTGGACATCA
ACAGACTGAGCGACTACGACGTCGACCACATCG

TCCCGCAGAGCTTCCTGAAGGACGACAGCATCG
ACAACAAGGTCCTGACAAGAAGCGACAAGAAC
AGAGGAAAGAGCGACAACGTCCCGAGCGAAGA
AGTCGTCAAGAAGATGAAGAAGTACTGGAGAC
AGCTGCTGAACGCAAAGCTGATCACACAGAGA
AAGTTCGACAACCTGACAAAGGCAGAGAGAGG
AGGACTGAGCGAACTGGACAAGGCAGGATTCA
TCAAGAGACAGCTGGTCGAAACAAGACAGATC
ACAAAGCACGTTCGCACAGATCCTGGACAGCAG
AATGAACACAAAGTACGACGAAAACGACAAGC
TGATCAGAGAAGTCAAGGTCATCACACTGAAGA
GCAAGCTGGTCAGCGACTTCAGAAAGGACTTCC
AGTTCTACAAGGTCAGAGAAATCAACAACCTACC
ACCACGCACACGACGCATACCTGAACGCAGTCG
TCGGAACAGCACTGATCAAGAAGTACCCGAAGC
TGGAAAGCGAATTCGTCTACGGAGACTACAAGG
TCTACGACGTCAGAAAGATGATCGCAAAGAGCG
AACAGGAAATCGGAAAGGCAACAGCAAAGTAC
TTCTTCTACAGCAACATCATGAACTTCTTCAAGA
CAGAAATCACACTGGCAAACGGAGAAATCAGA
AAGAGACCGCTGATCGAAACAAACGGAGAAAC
AGGAGAAATCGTCTGGGACAAGGGAAGAGACT
TCGCAACAGTCAGAAAGGTCCTGAGCATGCCGC
AGGTCAACATCGTCAAGAAGACAGAAGTCCAG
ACAGGAGGATTCAGCAAGGAAAGCATCCTGCC
GAAGAGAAACAGCGACAAGCTGATCGCAAGAA
AGAAGGACTGGGACCCGAAGAAGTACGGAGGA
TTCGACAGCCCGACAGTCGCATACAGCGTCCTG
GTCGTGCGCAAAGGTCGAAAAGGGAAAGAGCAA
GAAGCTGAAGAGCGTCAAGGAACTGCTGGGAA
TCACAATCATGGAAAGAAGCAGCTTCGAAAAG
AACCCGATCGACTTCCTGGAAGCAAAGGGATAC
AAGGAAGTCAAGAAGGACCTGATCATCAAGCT
GCCGAAGTACAGCCTGTTCGAACTGGAAAACGG
AAGAAAGAGAATGCTGGCAAGCGCAGGAGAAC

	<p>TGCAGAAGGGAAACGAACTGGCACTGCCGAGC AAGTACGTCAACTTCCTGTACCTGGCAAGCCAC TACGAAAAGCTGAAGGGAAGCCCAGGAAACAA CGAACAGAAGCAGCTGTTTCGTGCAACAGCACAA GCACTACCTGGACGAAATCATCGAACAGATCAG CGAATTCAGCAAGAGAGTCATCCTGGCAGACGC AAACCTGGACAAGGTCCTGAGCGCATAACAACAA GCACAGAGACAAGCCGATCAGAGAACAGGCAG AAAACATCATCCACCTGTTTCACTGACAAACC TGGGAGCACCGGCAGCATTCAAGTACTTCGACA CAACAATCGACAGAAAGAGATACACAAGCACA AAGGAAGTCCTGGACGCAACACTGATCCACCAG AGCATCACAGGACTGTACGAAACAAGAATCGA CCTGAGCCAGCTGGGAGGAGACGGAGGAGGAA GCCCCAAGAAGAAGAGAAAGGTCTAGCTAGCA CCAGCCTCAAGAACACCCGAATGGAGTCTCTAA GCTACATAATACTTACACTTTACAAAATG TTGTCCCCCAAATGTAGCCATTCGTATCTGCTC CTAATAAAAAGAAAGTTTCTTCACATTCTCTCG AG</p>	
<p>Транскрипт Cas 9 с первыми тремя нуклеотидами AGG для использования с CleanCap™, 5' UTR из HSD, ORF соответствующая SEQ ID №: 204, последовательность Kozak и 3' UTR к ALB</p>	<p>AGGTCCCGCAGTCGGCGTCCAGCGGCTCTGCTT GTTTCGTGTGTGTGTCGTTGCAGGCCTTATTCGGA TCCGCCACCATGGACAAGAAGTACAGCATCGGA CTGGACATCGGAACAAACAGCGTCGGATGGGC AGTCATCACAGACGAATACAAGGTCCCGAGCAA GAAGTTCAAGGTCCTGGGAAACACAGACAGAC ACAGCATCAAGAAGAACCTGATCGGAGCACTGC TGTTTCGACAGCGGAGAAACAGCAGAAGCAACA AGACTGAAGAGAACAGCAAGAAGAAGATACAC AAGAAGAAAGAACAGAATCTGCTACCTGCAGG AAATCTTCAGCAACGAAATGGCAAAGGTTCGACG ACAGCTTCTTCCACAGACTGGAAGAAAGCTTCC TGGTCGAAGAAGACAAGAAGCACGAAAGACAC CCGATCTTCGGAAACATCGTCGACGAAGTCGCA TACCACGAAAAGTACCCGACAATCTACCACCTG</p>	<p>261</p>

AGAAAGAAGCTGGTCGACAGCACAGACAAGGC
AGACCTGAGACTGATCTACCTGGCACTGGCACA
CATGATCAAGTTCAGAGGACACTTCCTGATCGA
AGGAGACCTGAACCCGGACAACAGCGACGTCG
ACAAGCTGTTTCATCCAGCTGGTCCAGACATA
ACCAGCTGTTTCGAAGAAAACCCGATCAACGCAA
GCGGAGTCGACGCAAAGGCAATCCTGAGCGCA
AGACTGAGCAAGAGCAGAAGACTGGAAAACCT
GATCGCACAGCTGCCGGGAGAAAAGAAGAACG
GACTGTTTCGGAAACCTGATCGCACTGAGCCTGG
GACTGACACCGAACTTCAAGAGCAACTTCGACC
TGGCAGAAGACGCAAAGCTGCAGCTGAGCAAG
GACACATACGACGACGACCTGGACAACCTGCTG
GCACAGATCGGAGACCAGTACGCAGACCTGTTC
CTGGCAGCAAAGAACCTGAGCGACGCAATCCTG
CTGAGCGACATCCTGAGAGTCAACACAGAAATC
ACAAAGGCACCGCTGAGCGCAAGCATGATCAA
GAGATACGACGAACACCACCAGGACCTGACACT
GCTGAAGGCACTGGTCAGACAGCAGCTGCCGGA
AAAGTACAAGGAAATCTTCTTCGACCAGAGCAA
GAACGGATACGCAGGATACATCGACGGAGGAG
CAAGCCAGGAAGAATTCTACAAGTTCATCAAGC
CGATCCTGGAAAAGATGGACGGAACAGAAGAA
CTGCTGGTCAAGCTGAACAGAGAAGACCTGCTG
AGAAAGCAGAGAACATTCGACAACGGAAGCAT
CCCGCACCAAGATCCACCTGGGAGAACTGCACGC
AATCCTGAGAAGACAGGAAGACTTCTACCCGTT
CCTGAAGGACAACAGAGAAAAGATCGAAAAGA
TCCTGACATTCAGAATCCCGTACTACGTCGGAC
CGCTGGCAAGAGGAAACAGCAGATTCGCATGG
ATGACAAGAAAGAGCGAAGAAACAATCACACC
GTGGAACCTTCGAAGAAGTCGTCGACAAGGGAG
CAAGCGCACAGAGCTTCATCGAAAGAATGACA
AACTTCGACAAGAACCTGCCGAACGAAAAGGTC
CTGCCGAAGCACAGCCTGCTGTACGAATACTTC

ACAGTCTACAACGAACTGACAAAGGTCAAGTAC
GTCACAGAAGGAATGAGAAAGCCGGCATTCTG
AGCGGAGAACAGAAGAAGGCAATCGTCGACCT
GCTGTTCAAGACAAACAGAAAGGTCACAGTCAA
GCAGCTGAAGGAAGACTACTTCAAGAAGATCG
AATGCTTCGACAGCGTCGAAATCAGCGGAGTCG
AAGACAGATTCAACGCAAGCCTGGGAACATACC
ACGACCTGCTGAAGATCATCAAGGACAAGGACT
TCCTGGACAACGAAGAAAACGAAGACATCCTG
GAAGACATCGTCCTGACACTGACACTGTTTCGAA
GACAGAGAAATGATCGAAGAAAGACTGAAGAC
ATACGCACACCTGTTTCGACGACAAGGTCATGAA
GCAGCTGAAGAGAAGAAGATACACAGGATGGG
GAAGACTGAGCAGAAAGCTGATCAACGGAATC
AGAGACAAGCAGAGCGGAAAGACAATCCTGGA
CTTCCTGAAGAGCGACGGATTTCGCAAACAGAAA
CTTCATGCAGCTGATCCACGACGACAGCCTGAC
ATTCAAGGAAGACATCCAGAAGGCACAGGTCA
GCGGACAGGGAGACAGCCTGCACGAACACATC
GCAAACCTGGCAGGAAGCCCGGCAATCAAGAA
GGGAATCCTGCAGACAGTCAAGGTCGTCGACGA
ACTGGTCAAGGTCATGGGAAGACACAAGCCGG
AAAACATCGTCATCGAAATGGCAAGAGAAAAC
CAGACAACACAGAAGGGACAGAAGAACAGCAG
AGAAAGAATGAAGAGAATCGAAGAAGGAATCA
AGGAACTGGGAAGCCAGATCCTGAAGGAACAC
CCGGTCGAAAACACACAGCTGCAGAACGAAAA
GCTGTACCTGTACTACCTGCAGAACGGAAGAGA
CATGTACGTCGACCAGGAACTGGACATCAACAG
ACTGAGCGACTACGACGTCGACCACATCGTCCC
GCAGAGCTTCCTGAAGGACGACAGCATCGACAA
CAAGGTCCTGACAAGAAGCGACAAGAACAGAG
GAAAGAGCGACAACGTCCCGAGCGAAGAAGTC
GTCAAGAAGATGAAGAACTACTGGAGACAGCT
GCTGAACGCAAAGCTGATCACACAGAGAAAGTT

CGACAACCTGACAAAGGCAGAGAGAGGAGGAC
TGAGCGAACTGGACAAGGCAGGATTCATCAAG
AGACAGCTGGTTCGAAACAAGACAGATCACAAA
GCACGTCGCACAGATCCTGGACAGCAGAATGAA
CACAAAGTACGACGAAAACGACAAGCTGATCA
GAGAAGTCAAGGTCATCACACTGAAGAGCAAG
CTGGTCAGCGACTTCAGAAAGGACTTCCAGTTC
TACAAGGTCAGAGAAATCAACAACCTACCACCAC
GCACACGACGCATACCTGAACGCAGTCGTCGGA
ACAGCACTGATCAAGAAGTACCCGAAGCTGGA
AAGCGAATTCGTCTACGGAGACTACAAGGTCTA
CGACGTCAGAAAGATGATCGCAAAGAGCGAAC
AGGAAATCGGAAAGGCAACAGCAAAGTACTTC
TTCTACAGCAACATCATGAACTTCTTCAAGACA
GAAATCACACTGGCAAACGGAGAAATCAGAAA
GAGACCGCTGATCGAAACAAACGGAGAAACAG
GAGAAATCGTCTGGGACAAGGGAAGAGACTTC
GCAACAGTCAGAAAGGTCCTGAGCATGCCGCAG
GTCAACATCGTCAAGAAGACAGAAGTCCAGAC
AGGAGGATTCAGCAAGGAAAGCATCCTGCCGA
AGAGAAACAGCGACAAGCTGATCGCAAGAAAG
AAGGACTGGGACCCGAAGAAGTACGGAGGATT
CGACAGCCCGACAGTCGCATACAGCGTCCTGGT
CGTCGCAAAGGTCGAAAAGGGAAAGAGCAAGA
AGCTGAAGAGCGTCAAGGAACTGCTGGGAATC
ACAATCATGGAAAGAAGCAGCTTCGAAAAGAA
CCCGATCGACTTCTGGAAGCAAAGGGATACAA
GGAAGTCAAGAAGGACCTGATCATCAAGCTGCC
GAAGTACAGCCTGTTCGAACTGGAACCGGAA
GAAAGAGAATGCTGGCAAGCGCAGGAGAACTG
CAGAAGGGAAACGAACTGGCACTGCCGAGCAA
GTACGTCAACTTCTGTACCTGGCAAGCCACTA
CGAAAAGCTGAAGGGAAGCCCGGAAGACAACG
AACAGAAGCAGCTGTTCGTCGAACAGCACAAAGC
ACTACCTGGACGAAATCATCGAACAGATCAGCG

		<p>AATTCAGCAAGAGAGTCATCCTGGCAGACGCAA ACCTGGACAAGGTCCTGAGCGCATAACAAGC ACAGAGACAAGCCGATCAGAGAACAGGCAGAA AACATCATCCACCTGTTCACTGACAAACCTG GGAGCACCGGCAGCATTCAAGTACTTCGACACA ACAATCGACAGAAAGAGATACACAAGCACAAA GGAAGTCCTGGACGCAACACTGATCCACCAGAG CATCACAGGACTGTACGAAACAAGAATCGACCT GAGCCAGCTGGGAGGAGACGGAGGAGGAAGCC CGAAGAAGAAGAGAAAGGTCTAGCTAGCCATC ACATTTAAAAGCATCTCAGCCTACCATGAGAAT AAGAGAAAGAAAATGAAGATCAATAGCTTATTC ATCTCTTTTTCTTTTTCGTTGGTGTAAAGCCAAC ACCCTGTCTAAAAAACATAAATTTCTTTAATCAT TTTGCCTCTTTTCTCTGTGCTTCAATTAATAAAA AATGGAAAGAACCTCGAG</p>	
30/30/39 последовательность	поли-А	Не используется	262
Поли-А последовательность	100	<p>AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA</p>	263
G209 РНК таргетирующая мышинный TTR ген	одноцепочечной гида,	<p>AAATAAGAGAGAAAAGAAGAGTAAGAAGAAAT ATAAGAGCCACC</p>	264
ORF кодирующая Cas9 из <i>Neisseria meningitidis</i> , используя минимальные кодоны уридина со старт и стоп кодонами		<p>ATGGCAGCATTCAAGCCGAACCTCGATCAACTAC ATCCTGGGACTGGACATCGGAATCGCATCGGTC GGATGGGCAATGGTCGAAATCGACGAAGAAGA AAACCCGATCAGACTGATCGACCTGGGAGTCAG AGTCTTCGAAAGAGCAGAAGTCCCGAAGACAG GAGACTCGCTGGCAATGGCAAGAAGACTGGCA AGATCGGTCAGAAGACTGACAAGAAGAAGAGC ACACAGACTGCTGAGAACAAGAAGACTGCTGA AGAGAGAAGGAGTCCTGCAGGCAGCAAACCTTC GACGAAAACGGACTGATCAAGTCGCTGCCGAAC</p>	265

ACACCGTGGCAGCTGAGAGCAGCAGCACTGGA
CAGAAAGCTGACACCGCTGGAATGGTCGGCAGT
CCTGCTGCACCTGATCAAGCACAGAGGATACCT
GTCGCAGAGAAAGAACGAAGGAGAAACAGCAG
ACAAGGAACTGGGAGCACTGCTGAAGGGAGTC
GCAGGAAACGCACACGCACTGCAGACAGGAGA
CTTCAGAACACCGGCAGAACTGGCACTGAACAA
GTTTCGAAAAGGAATCGGGACACATCAGAAACC
AGAGATCGGACTACTCGCACACATTCTCGAGAA
AGGACCTGCAGGCAGAACTGATCCTGCTGTTCG
AAAAGCAGAAGGAATTCGGAAACCCGCACGTC
TCGGGAGGACTGAAGGAAGGAATCGAAACACT
GCTGATGACACAGAGACCGGCACTGTCGGGAG
ACGCAGTCCAGAAGATGCTGGGACACTGCACAT
TCGAACCGGCAGAACCGAAGGCAGCAAAGAAC
ACATACACAGCAGAAAGATTCATCTGGCTGACA
AAGCTGAACAACCTGAGAATCCTGGAACAGGG
ATCGGAAAGACCGCTGACAGACACAGAAAGAG
CAACTGATGGACGAACCGTACAGAAAGTCG
AAGCTGACATACGCACAGGCAAGAAAGCTGCT
GGGACTGGAAGACACAGCATTCTTCAAGGGACT
GAGATACGGAAAGGACAACGCAGAAAGCATCGA
CACTGATGGAAATGAAGGCATACCACGCAATCT
CGAGAGCACTGGAAAAGGAAGGACTGAAGGAC
AAGAAGTCGCCGCTGAACCTGTCGCCGGAAC TG
CAGGACGAAATCGGAACAGCATTCTCGCTGTTC
AAGACAGACGAAGACATCACAGGAAGACTGAA
GGACAGAATCCAGCCGGAATCCTGGAAGCACT
GCTGAAGCACATCTCGTTCGACAAGTTCGTCCA
GATCTCGCTGAAGGCACTGAGAAGAATCGTCCC
GCTGATGGAACAGGGAAAGAGATACGACGAAG
CATGCGCAGAAATCTACGGAGACCACTACGGAA
AGAAGAACACAGAAGAAAAGATCTACCTGCCG
CCGATCCCGGCAGACGAAATCAGAAACCCGGTC
GTCCTGAGAGCACTGTCGCAGGCAAGAAAGGTC

ATCAACGGAGTCGTCAGAAGATACGGATCGCCG
GCAAGAATCCACATCGAAACAGCAAGAGAAGT
CGGAAAGTCGTTCAAGGACAGAAAGGAAATCG
AAAAGAGACAGGAAGAAAACAGAAAGGACAG
AGAAAAGGCAGCAGCAAAGTTCAGAGAATACT
TCCCGAACTTCGTCGGAGAACCGAAGTCGAAGG
ACATCCTGAAGCTGAGACTGTACGAACAGCAGC
ACGGAAAGTGCCTGTACTCGGGAAAGGAAATC
AACCTGGGAAGACTGAACGAAAAGGGATACGT
CGAAATCGACCACGCACTGCCGTTCTCGAGAAC
ATGGGACGACTCGTTCAACAACAAGGTCCTGGT
CCTGGGATCGGAAAACCAGAACAAGGGAAACC
AGACACCGTACGAATACTTCAACGGAAAGGAC
AACTCGAGAGAATGGCAGGAATTC AAGGCAAG
AGTCGAAACATCGAGATTCCCGAGATCGAAGAA
GCAGAGAATCCTGCTGCAGAAGTTCGACGAAGA
CGGATTCAAGGAAAGAAACCTGAACGACACAA
GATACGTCAACAGATTCTGTGCCAGTTCGTCG
CAGACAGAATGAGACTGACAGGAAAGGGAAAG
AAGAGAGTCTTCGCATCGAACGGACAGATCACA
AACCTGCTGAGAGGATTCTGGGGACTGAGAAAG
GTCAGAGCAGAAAACGACAGACACCACGCACT
GGACGCAGTCGTCGTCGCATGCTCGACAGTCGC
AATGCAGCAGAAGATCACAAGATTCGTCAGATA
CAAGGAAATGAACGCATTCGACGGAAAGACAA
TCGACAAGGAAACAGGAGAAGTCCTGCACCAG
AAGACACACTTCCCGCAGCCGTGGGAATTCTTC
GCACAGGAAGTCATGATCAGAGTCTTCGGAAAG
CCGGACGGAAAGCCGGAATTCGAAGAAGCAGA
CACACTGGAAAAGCTGAGAACACTGCTGGCAG
AAAAGCTGTCGTCGAGACCGGAAGCAGTCCACG
AATACGTCACACCGCTGTTCGTCTCGAGAGCAC
CGAACAGAAAGATGTCGGGACAGGGACACATG
GAAACAGTCAAGTCGGCAAAGAGACTGGACGA
AGGAGTCTCGGTCCTGAGAGTCCCGCTGACACA

	<p>GCTGAAGCTGAAGGACCTGGAAAAGATGGTCA ACAGAGAAAGAGAACCGAAGCTGTACGAAGCA CTGAAGGCAAGACTGGAAGCACACAAGGACGA CCCGGCAAAGGCATTCGCAGAACCGTTCTACAA GTACGACAAGGCAGGAAACAGAACACAGCAGG TCAAGGCAGTCAGAGTCGAACAGGTCCAGAAG ACAGGAGTCTGGGTCAGAAACCACAACGGAAT CGCAGACAACGCAACAATGGTCAGAGTAGACG TCTTCGAAAAGGGAGACAAGTACTACCTGGTCC CGATCTACTCGTGGCAGGTCGCAAAGGGAATCC TGCCGGACAGAGCAGTCGTCCAGGGAAAGGAC GAAGAAGACTGGCAGCTGATCGACGACTCGTTC AACTTCAAGTTCTCGCTGCACCCGAACGACCTG GTCGAAGTCATCACAAAGAAGGCAAGAATGTTC GGATACTTCGCATCGTGCCACAGAGGAACAGGA AACATCAACATCAGAATCCACGACCTGGACCAC AAGATCGGAAAGAACGGAATCCTGGAAGGAAT CGGAGTCAAGACAGCACTGTCGTTCCAGAAGTA CCAGATCGACGAACTGGGAAAGGAAATCAGAC CGTGCAGACTGAAGAAGAGACCGCCGGTCAGA TCCGGAAAGAGAACAGCAGACGGATCGGAATT CGAATCGCCGAAGAAGAAGAGAAAGGTCTGAAT GA</p>	
<p>ORF, кодирующая Cas9 из <i>Neisseria meningitidis</i>, с использованием минимальных кодонов уридина (не старт и стоп кодонов, уместных для включения в последовательность, кодирующую гибридный белок)</p>	<p>GCAGCATTCAAGCCGAACCTCGATCAACTACATC CTGGGACTGGACATCGGAATCGCATCGGTCGGA TGGGCAATGGTTCGAAATCGACGAAGAAGAAA CCCGATCAGACTGATCGACCTGGGAGTCAGAGT CTTCGAAAGAGCAGAAGTCCCGAAGACAGGAG ACTCGCTGGCAATGGCAAGAAGACTGGCAAGAT CGGTCAGAAGACTGACAAGAAGAAGAGCACAC AGACTGCTGAGAACAAGAAGACTGCTGAAGAG AGAAGGAGTCCTGCAGGCAGCAAACCTTCGACG AAAACGGACTGATCAAGTCGCTGCCGAACACAC CGTGGCAGCTGAGAGCAGCAGCACTGGACAGA AAGCTGACACCGCTGGAATGGTCGGCAGTCCTG</p>	<p>266</p>

CTGCACCTGATCAAGCACAGAGGATACCTGTCTG
CAGAGAAAGAACGAAGGAGAAACAGCAGACAA
GGAACCTGGGAGCACTGCTGAAGGGAGTCGCAG
GAAACGCACACGCACTGCAGACAGGAGACTTC
AGAACACCGGCAGAACTGGCACTGAACAAGTTC
GAAAAGGAATCGGGACACATCAGAAACCAGAG
ATCGGACTACTCGCACACATTCTCGAGAAAGGA
CCTGCAGGCAGAACTGATCCTGCTGTTTCGAAA
GCAGAAGGAATTTCGGAAACCCGCACGTCTCGGG
AGGACTGAAGGAAGGAATCGAAACACTGCTGA
TGACACAGAGACCGGCACTGTCGGGAGACGCA
GTCCAGAAGATGCTGGGCACTGCACATTCGAA
CCGGCAGAACCGAAGGCAGCAAAGAACACATA
CACAGCAGAAAGATTCATCTGGCTGACAAAGCT
GAACAACCTGAGAATCCTGGAACAGGGATCGG
AAAGACCGCTGACAGACACAGAAAGAGCAACA
CTGATGGACGAACCGTACAGAAAGTCGAAGCTG
ACATACGCACAGGCAAGAAAGCTGCTGGGACT
GGAAGACACAGCATTCTTCAAGGGACTGAGATA
CGGAAAGGACAACGCAGAAGCATCGCACTGA
TGGAATGAAGGCATACCACGCAATCTCGAGAG
CACTGGAAAAGGAAGGACTGAAGGACAAGAAG
TCGCCGCTGAACCTGTCGCCGGAAGTGCAGGAC
GAAATCGGAACAGCATTCTCGCTGTTCAAGACA
GACGAAGACATCACAGGAAGACTGAAGGACAG
AATCCAGCCGGAATCCTGGAAGCACTGCTGAA
GCACATCTCGTTCGACAAGTTCGTCCAGATCTC
GCTGAAGGCACTGAGAAGAATCGTCCCGCTGAT
GGAACAGGGAAAGAGATACGACGAAGCATGCG
CAGAAATCTACGGAGACCACTACGGAAAGAAG
AACACAGAAGAAAAGATCTACCTGCCGCCGATC
CCGGCAGACGAAATCAGAAACCCGGTCGTCTG
AGAGCACTGTCGCAGGCAAGAAAGGTCATCAA
CGGAGTCGTGAGAAGATACGGATCGCCGGCAA
GAATCCACATCGAAACAGCAAGAGAAGTTCGGA

AAGTCGTTCAAGGACAGAAAGGAAATCGAAAA
GAGACAGGAAGAAAACAGAAAGGACAGAGAA
AAGGCAGCAGCAAAGTTCAGAGAATACTTCCCG
AACTTCGTCTGGAGAACCGAAGTCGAAGGACATC
CTGAAGCTGAGACTGTACGAACAGCAGCACGG
AAAGTGCCTGTACTCGGGAAAGGAAATCAACCT
GGGAAGACTGAACGAAAAGGGATACGTCGAAA
TCGACCACGCACTGCCGTTCTCGAGAACATGGG
ACGACTCGTTCAACAACAAGGTCTGGTCCTGG
GATCGGAAAACCAGAACAAGGGAAACCAGACA
CCGTACGAATACTTCAACGGAAAGGACAACCTCG
AGAGAATGGCAGGAATTCAAGGCAAGAGTCGA
AACATCGAGATTCCCGAGATCGAAGAAGCAGA
GAATCCTGCTGCAGAAGTTCGACGAAGACGGAT
TCAAGGAAAGAAACCTGAACGACACAAGATAC
GTCAACAGATTCTGTGCCAGTTCGTCGCAGAC
AGAATGAGACTGACAGGAAAGGGAAAGAAGAG
AGTCTTCGCATCGAACGGACAGATCACAAACCT
GCTGAGAGGATTCTGGGGACTGAGAAAGGTCA
GAGCAGAAAACGACAGACACCACGCACTGGAC
GCAGTCGTCGTCGCATGCTCGACAGTCGCAATG
CAGCAGAAGATCACAAGATTCGTCAGATACAAG
GAAATGAACGCATTTCGACGGAAAGACAATCGA
CAAGGAAACAGGAGAAGTCCTGCACCAGAAGA
CACACTTCCCAGCCGTGGGAATTCTTCGCAC
AGGAAGTCATGATCAGAGTCTTCGGAAAGCCGG
ACGGAAAGCCGAATTCGAAGAAGCAGACACA
CTGGAAAAGCTGAGAACACTGCTGGCAGAAAA
GCTGTCGTCGAGACCGGAAGCAGTCCACGAATA
CGTCACACCGCTGTTCGTCTCGAGAGCACCGAA
CAGAAAGATGTCTGGGACAGGGACACATGGAAA
CAGTCAAGTCGGCAAAGAGACTGGACGAAGGA
GTCTCGGTCTGAGAGTCCCGCTGACACAGCTG
AAGCTGAAGGACCTGGAAAAGATGGTCAACAG
AGAAAGAGAACCGAAGCTGTACGAAGCACTGA

	AGGCAAGACTGGAAGCACACAAGGACGACCCG GCAAAGGCATTCGCAGAACCGTTCTACAAGTAC GACAAGGCAGGAAACAGAACACAGCAGGTCAA GGCAGTCAGAGTCGAACAGGTCCAGAAGACAG GAGTCTGGGTCAGAAACCACAACGGAATCGCA GACAACGCAACAATGGTCAGAGTAGACGTCTTC GAAAAGGGAGACAAGTACTACCTGGTCCCGATC TACTCGTGGCAGGTTCGCAAAGGGAATCCTGCCG GACAGAGCAGTCGTCCAGGGAAAGGACGAAGA AGACTGGCAGCTGATCGACGACTCGTTCAACTT CAAGTTCTCGCTGCACCCGAACGACCTGGTTCGA AGTCATCACAAAGAAGGCAAGAATGTTCCGGATA CTTCGCATCGTGCCACAGAGGAACAGGAAACAT CAACATCAGAATCCACGACCTGGACCACAAGAT CGGAAAGAACGGAATCCTGGAAGGAATCGGAG TCAAGACAGCACTGTCGTTCCAGAAGTACCAGA TCGACGAACTGGGAAAGGAAATCAGACCGTGC AGACTGAAGAAGAGACCGCCGGTCAGATCCGG AAAGAGAACAGCAGACGGATCGGAATTCGAAT CGCCGAAGAAGAAGAGAAAGGTCGAA	
Транскрипт, включающий SEQ ID №: 265 (кодирующий Cas9 Neisseria meningitidis)	GGGAGACCCAAGCTGGCTAGCGTTTAAACTTAA GCTTGGATCCGCCACCATGGCAGCATTCAAGCC GAACTCGATCAACTACATCCTGGGACTGGACAT CGGAATCGCATCGGTTCGGATGGGCAATGGTCGA AATCGACGAAGAAGAAAACCCGATCAGACTGA TCGACCTGGGAGTCAGAGTCTTCGAAAGAGCAG AAGTCCCGAAGACAGGAGACTCGCTGGCAATG GCAAGAAGACTGGCAAGATCGGTTCAGAAGACT GACAAGAAGAAGAGCACACAGACTGCTGAGAA CAAGAAGACTGCTGAAGAGAGAAGGAGTCCTG CAGGCAGCAAACCTTCGACGAAAACGGACTGATC AAGTCGCTGCCGAACACACCGTGGCAGCTGAGA GCAGCAGCACTGGACAGAAAGCTGACACCGCT GGAATGGTCGGCAGTCCTGCTGCACCTGATCAA GCACAGAGGATACCTGTTCGACAGAGAAAGAACG	267

AAGGAGAAACAGCAGACAAGGAACTGGGAGCA
CTGCTGAAGGGAGTCGCAGGAAACGCACACGC
ACTGCAGACAGGAGACTTCAGAACACCGGCAG
AACTGGCACTGAACAAGTTCGAAAAGGAATCG
GGACACATCAGAAACCAGAGATCGGACTACTCG
CACACATTCTCGAGAAAGGACCTGCAGGCAGAA
CTGATCCTGCTGTTTCGAAAAGCAGAAGGAATTC
GGAAACCCGCACGTCTCGGGAGGACTGAAGGA
AGGAATCGAAACACTGCTGATGACACAGAGAC
CGGCACTGTCGGGAGACGCAGTCCAGAAGATGC
TGGGACACTGCACATTCGAACCGGCAGAACCGA
AGGCAGCAAAGAACACATACACAGCAGAAAGA
TTCATCTGGCTGACAAAGCTGAACAACCTGAGA
ATCCTGGAACAGGGATCGGAAAGACCGCTGAC
AGACACAGAAAGAGCAACACTGATGGACGAAC
CGTACAGAAAGTCGAAGCTGACATACGCACAG
GCAAGAAAGCTGCTGGGACTGGAAGACACAGC
ATTCTTCAAGGGACTGAGATACGGAAAGGACAA
CGCAGAAGCATCGACACTGATGGAAATGAAGG
CATAACCACGCAATCTCGAGAGCACTGGAAAAGG
AAGGACTGAAGGACAAGAAGTCGCCGCTGAAC
CTGTCGCCGGAACCTGCAGGACGAAATCGGAACA
GCATTCTCGCTGTTCAAGACAGACGAAGACATC
ACAGGAAGACTGAAGGACAGAATCCAGCCGGA
AATCCTGGAAGCACTGCTGAAGCACATCTCGTT
CGACAAGTTCGTCCAGATCTCGCTGAAGGCACT
GAGAAGAATCGTCCCGCTGATGGAACAGGGAA
AGAGATACGACGAAGCATGCGCAGAAATCTAC
GGAGACCACTACGGAAAGAAGAACACAGAAGA
AAAGATCTACCTGCCGCCGATCCCGGCAGACGA
AATCAGAAACCCGGTCGTCCTGAGAGCACTGTC
GCAGGCAAGAAAGGTCATCAACGGAGTCGTCA
GAAGATACGGATCGCCGGCAAGAATCCACATCG
AAACAGCAAGAGAAGTCGGAAAGTCGTTCAAG
GACAGAAAGGAAATCGAAAAGAGACAGGAAGA

AAACAGAAAGGACAGAGAAAAGGCAGCAGCAA
AGTTCAGAGAATACTTCCCGAACTTCGTCCGAG
AACCGAAGTCGAAGGACATCCTGAAGCTGAGA
CTGTACGAACAGCAGCACGGAAAGTGCCTGTAC
TCGGGAAAGGAAATCAACCTGGGAAGACTGAA
CGAAAAGGGATACGTTCGAAATCGACCACGCACT
GCCGTTCTCGAGAACATGGGACGACTCGTTCAA
CAACAAGGTCCTGGTCCTGGGATCGGAAAACCA
GAACAAGGGAAACCAGACACCGTACGAATACT
TCAACGGAAAGGACAACCTCGAGAGAATGGCAG
GAATTCAAGGCAAGAGTCGAAACATCGAGATTC
CCGAGATCGAAGAAGCAGAGAATCCTGCTGCA
GAAGTTCGACGAAGACGGATTCAAGGAAAGAA
ACCTGAACGACACAAGATACGTCAACAGATTCC
TGTGCCAGTTCGTTCGACAGAGAATGAGACTGA
CAGGAAAGGGAAAGAAGAGAGTCTTCGCATCG
AACGGACAGATCACAAACCTGCTGAGAGGATTC
TGGGGACTGAGAAAGGTCAGAGCAGAAAACGA
CAGACACCACGCACTGGACGCAGTCGTTCGTCGC
ATGCTCGACAGTCGCAATGCAGCAGAAGATCAC
AAGATTCGTCAGATACAAGGAAATGAACGCATT
CGACGGAAAGACAATCGACAAGGAAACAGGAG
AAGTCCTGCACCAGAAGACACACTTCCCGCAGC
CGTGGGAATTCTTCGCACAGGAAGTCATGATCA
GAGTCTTCGAAAGCCGGACGGAAAGCCGGAA
TTCGAAGAAGCAGACACACTGGAAAAGCTGAG
AACACTGCTGGCAGAAAAGCTGTTCGTCGAGACC
GGAAGCAGTCCACGAATACGTTCACACCGCTGTT
CGTCTCGAGAGCACCGAACAGAAAGATGTCCG
GACAGGGACACATGGAAACAGTCAAGTCGGCA
AAGAGACTGGACGAAGGAGTCTCGGTCCTGAG
AGTCCCGCTGACACAGCTGAAGCTGAAGGACCT
GGAAAAGATGGTCAACAGAGAAAGAGAACCGA
AGCTGTACGAAGCACTGAAGGCAAGACTGGAA
GCACACAAGGACGACCCGGCAAAGGCATTTCGC

	<p>AGAACCGTTCTACAAGTACGACAAGGCAGGAA ACAGAACACAGCAGGTCAAGGCAGTCAGAGTC GAACAGGTCCAGAAGACAGGAGTCTGGGTCAG AAACCACAACGGAATCGCAGACAACGCAACAA TGGTCAGAGTAGACGTCTTCGAAAAGGGAGACA AGTACTACCTGGTCCCGATCTACTCGTGGCAGG TCGCAAAGGGAATCCTGCCGGACAGAGCAGTCG TCCAGGGAAAGGACGAAGAAGACTGGCAGCTG ATCGACGACTCGTTCAACTTCAAGTTCTCGCTGC ACCCGAACGACCTGGTCGAAGTCATCACAAAGA AGGCAAGAATGTTCCGATACTTCGCATCGTGCC ACAGAGGAACAGGAAACATCAACATCAGAATC CACGACCTGGACCACAAGATCGGAAAGAACGG AATCCTGGAAGGAATCGGAGTCAAGACAGCACT GTCGTTCCAGAAGTACCAGATCGACGAACTGGG AAAGGAAATCAGACCGTGCAGACTGAAGAAGA GACCGCCGGTCAGATCCGGAAAGAGAACAGCA GACGGATCGGAATTCGAATCGCCGAAGAAGAA GAGAAAGGTCGAATGATAGCTAGCTCGAGTCTA GAGGGCCCGTTTAAACCCGCTGATCAGCCTCGA CTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTG CCCCTCCCCCGTGCCTTCCTTGACCCTGGAAGGT GCCACTCCCCTGTCCTTTCCTAATAAAATGAG GAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCAT TCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGC AAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCA TGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGG</p>	
<p>Аминокислотная последовательность Cas 9 <i>Neisseria meningitidis</i></p>	<p>MAAFKPNSINYILGLDIGIASVGVAMVEIDEEENPI RLIDLGVRVFERAEVPGTGDSLAMARRLARSVRR LTRRRAHRLLRTRRLKREGVLQAANFDENGLIKS LPNTPWQLRAAALDRKLTPLEWSAVLLHLIKHRG YLSQRKNEGETADKELGALLKGVAGNAHALQTG DFRTPAELALNKFEKESGHIRNQRSYSHTFSRKD LQAELILLFEKQKEFGNPHVSGGLKEGIETLLMTQ RPALSGDAVQKMLGHCTFEPAPKAANKNTYTAER</p>	<p>268</p>

	<p>FIWLTKLNNLRILEQGSRPLDTERATLMDEPYR KSKLTYAQARKLLGLEDTAFFKGLRYGKDNAEAS TLMEMKAYHAISRALEKEGLKDKKSPNLSPQLQ DEIGTAFSLFKTDEDITGRLKDRIQPEILEALLKHS FDKFVQISLKALRRIVPLMEQGKRYDEACAEIYGD HYGKKNTEEKIYLPIPADEIRNPVVLRAALSQARK VINGVRRYRGSPARIHIETAREVGKSFKDRKEIEKR QEENRKDREKAAAKFREYFPNFVGEPKSKDILKLR LYEQQHKGKCLYSGKEINLGRLENEKGYVEIDHALPF SRTWDDSFNNKVLVLGSENQNKGNQTPYEYFNG KDNSREWQEFKARVETSRFPRSKKQRILLQKFDED GFKERNLNDTRYVNRFLCQFVADRMRLTGKGKK RVFASNGQITNLLRGFWGLRKVRAENDRRHHALD AVVVACSTVAMQQKITRFVRYKEMNAFDGKTID KETGEVLHQKTHFPQPWEFFAQEVMIRVFGKPDG KPEFEEADTLEKLRLLAEKLSRPEAVHEYVTPL FVSRAPNRKMSGQGHMETVKSARKLDEGVSVLR VPLTQLKLDLEKMNREREPKLYEALKARLEAH KDDPAKAFAPFYKYDKAGNRTQQVKAVRVEQV QKTGVWVRNHNGIADNATMVRVDVFEKGDKYY LVPIYSWQVAKGILPDRAVVQKDEEDWQLIDDS FNFKFSLHPNDLVEVITKKARMFYFASCHRG TG NINIRIHDLDHKIGKNGILEGIGVKTALSFQKYQID ELGKEIRPCRLKKRPPVRS GKRTADGSEFESPKKK RKVE</p>	
G390 одноцепочечная РНК гид, таргетная к крысиному TTR гену	<p>mG*mC*mC*GAGUCUGGAGAGCUGCAGUUUA GAmGmCmUmAmGmAmAmUmAmGmCAAGU UAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUm UmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCm GmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU</p>	269
trRNA	<p>AACAGCAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCC GUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGG UGCuuuuuuu</p>	270
	Не используется	271
G534 одноцепочечная	<p>mA*mC*mG*CAAUAUCAGUCCAGCGGUUUUA</p>	272

PHK гид, таргетная к крысиному TTR гену		GAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGU UAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUm UmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCm GmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	
G000395 процессированная модифицированная последовательность неактивной sgRNA	5'	mG*mC*mA*AUGGUGUAGCGGGUUUUAGAmGm CmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAU AAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAm AmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGm UmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	273
SV40 NLS		PKKKRKV	274
Альтернативный NLS SV40		PKKKRRV	275
Нуклеоплазмин NLS		KRPAATKKAGQAKKKK	276
Иллюстративная последовательность Kozak		gccRccAUGG	277
Иллюстративная последовательность Kozak		gccgccRccAUGG	278

* = PS сцепление; «m» = 2'-O-Ме нуклеотид

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ индукции двухцепочечного разрыва (DSB) в гене TTR, включающий доставку композиции в клетку, при этом композиция включает:

- 1) РНК гид, включающий последовательность гида, выбранную из SEQ ID № 5-82;
- 2) РНК гид, который включает по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов последовательности, выбранной из SEQ ID №: 5-82; или:
- 3) РНК гид, который включает последовательность гида, которая по меньшей мере на 99, 98, 97, 96, 95, 94, 93, 92, 91% или 90% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID №: 5-82.

2. Способ модификации гена TTR, включающий доставку композиции в клетку, при этом композиция содержит (i) агент, связывающий РНК гид с ДНК, или нуклеиновую кислоту, кодирующую агент, связывающий РНК гид с ДНК и (ii) РНК гид, включающий:

- 1) последовательность гида, выбранную из SEQ ID №: 5-82;
- 2) по меньшей мере 17, 18, 19, или 20 смежных нуклеотидов последовательности, выбранной из SEQ ID №: 5-82; или:
- 3) последовательность гида, которая является по меньшей мере на 99, 98, 97, 96, 95, 94, 93, 92, 91% или 90% идентичной последовательности, выбранной из SEQ ID №: 5-82.

3. Способ лечения амилоидоза, ассоциированного с TTR (ATTR), включающий доставку композиции нуждающемуся в ней субъекту, при этом композиция включает (i) агент, связывающий РНК гид с ДНК, или нуклеиновую кислоту, кодирующую агент, связывающий РНК гид с ДНК и (ii) РНК гид, включающий:

- 1) последовательность гида, выбранную из SEQ ID №: 5-82;
- 2) по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов последовательности, выбранной из SEQ ID №: 5-82; или:
- 3) последовательность гида, которая является по меньшей мере на 99, 98, 97, 96, 95, 94, 93, 92, 91% или 90% идентичной последовательности, выбранной из SEQ ID №: 5-82, обеспечивая тем самым лечение ATTR.

4. Способ снижения концентрации TTR в сыворотке, который включает введение композиции нуждающемуся в ней субъекту, при этом композиция содержит (i) агент, связывающий РНК гид с ДНК, или нуклеиновую кислоту, кодирующую агент, связывающий РНК гид с ДНК и (ii) РНК гид, который включает:

- 1) последовательность гида, выбранную из SEQ ID №: 5-82;
- 2) по меньшей мере, 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов последовательности, выбранной из SEQ ID №: 5-82; или:
- 3) последовательность гида, которая является по меньшей мере на 99, 98, 97, 96, 95, 94, 93, 92, 91% или 90% идентичной последовательности, выбранной из SEQ ID №: 5-82, обеспечивая тем самым снижение концентрации TTR в сыворотке.

5. Способ снижения или предотвращения накопления амилоидов или амилоидных фибрилл, содержащих у субъекта, при этом TTR включает введение композиции нуждающемуся в ней субъекту, при этом композиция содержит (i) агент, связывающий

РНК гид с ДНК, или нуклеиновую кислоту, кодирующую агент, при этом связывающий РНК гид с ДНК и (ii) РНК гид включает:

- 1) последовательность гида, выбранную из SEQ ID №: 5-82;
 - 2) по меньшей мере 17, 18, 19, или 20 смежных нуклеотидов последовательности, выбранной из SEQ ID №: 5-82; или:
 - 3) последовательность гида, которая является по меньшей мере на 99, 98, 97, 96, 95, 94, 93, 92, 91% или 90% идентичной последовательности, выбранной из SEQ ID №: 5-82, обеспечивая тем самым снижение накопления амилоидов или амилоидных фибрилл.
6. Композиция, которая включает РНК гид, содержащий:
- 1) последовательность гида, выбранную из SEQ ID №: 5-82;
 - 2) по меньшей мере 17, 18, 19, или 20 смежных нуклеотидов последовательности, выбранной из SEQ ID №: 5-82; или:
 - 3) последовательность гида, которая является по меньшей мере на 99, 98, 97, 96, 95, 94, 93, 92, 91% или 90% идентичной последовательности выбранной из SEQ ID №: 5-82.
7. Композиция, которая включает вектор, кодирующий РНК гид, при этом РНК гид содержит:
- 1) последовательность гида, которая выбрана из SEQ ID №: 5-82;
 - 2) по меньшей мере 17, 18, 19, или 20 смежных нуклеотидов последовательности, выбранной из SEQ ID №: 5-82; или
 - 3) последовательность гида, которая является по меньшей мере на 99, 98, 97, 96, 95, 94, 93, 92, 91% или 90% идентичной последовательности, выбранной из SEQ ID №: 5-82.
8. Композиция по п.п. 6 или 7, отличающаяся тем, что используется для индукции двойных разрывов (DSB) гена TTR в клетке или у субъекта.
9. Композиция по п.п. 6 или 7, отличающаяся тем, что используется для модификации гена TTR в клетке или у субъекта.
10. Композиция по п.п. 6 или 7, отличающаяся тем, что используется для лечения амилоидоза, ассоциированного с TTR (ATTR) у субъекта.
11. Композиция по п.п. 6 или 7, отличающаяся тем, что используется для снижения концентрации TTR в сыворотке субъекта.
12. Композиция по п.п. 6 или 7, отличающаяся тем, что используется для снижения или предотвращения накопления амилоидов или амилоидных фибрилл у субъекта.
13. Способ по любому из п.п. 1-5 или композиция по любому из п.п. 8-12, отличающиеся тем, что композиция снижает уровни TTR в сыворотке.
14. Способ или композиция по п. 13, отличающиеся тем, что уровни TTR в сыворотке снижаются по меньшей мере на 50%, по сравнению с уровнями TTR в сыворотке перед введением композиции.
15. Способ или композиция по п. 13, отличающиеся тем, что уровни TTR снижаются на 50-60%, 60-70%, 70-80%, 80-90%, 90-95%, 95-98%, 98-99% или 99-100%, по сравнению с уровнями TTR в сыворотке перед введением композиции.
16. Способ по п.п. 1-5 или композиция по п.п. 8-15, отличающиеся тем, что

композиция вызывает редактирование гена TTR.

17. Способ или композиция по п. 16, отличающиеся тем, что рассчитывают процент от редактируемой выборки (процент редактирования).

18. Способ или композиция по п. 17, отличающиеся тем, что процент редактирования составляет от 30 до 99% от выборки.

19. Способ или композиция по п. 17, отличающиеся тем, что процент редактирования составляет между 30 и 35%, 35 и 40%, 40 и 45%, 45 и 50%, 50 и 55%, 55 и 60%, 60 и 65%, 65 и 70%, 70 и 75%, 75 и 80%, 80 и 85%, 85 и 90%, 90 и 95%, или 95 и 99% от выборки.

20. Способ по любому из п.п. 1-5 или композиция по любому из п.п. 8-19, отличающиеся тем, что композиция снижает накопление амилоидов по меньшей мере в одной ткани.

21. Способ или композиция по п. 20, отличающиеся тем, что по меньшей мере одна ткань включает одно или более из следующего: желудок, кишечник, седалищный нерв или ганглии седалищного нерва.

22. Способ или композиция по п.п. 20 или 21, отличающиеся тем, что накопление амилоидов измеряют через 8 недель после введения композиции.

23. Способ или композиция по любому из п.п. 20-22, отличающиеся тем, что накопление амилоидов сравнивают с отрицательным контролем или уровнем, измеренным перед введением композиции.

24. Способ или композиция по любому из п.п. 20-23, отличающиеся тем, что накопление амилоидов определяют в биопсийных образцах и/или при иммуноокрашивании.

25. Способ или композиция по любому из п.п. 20-24, отличающиеся тем, что накопление амилоидов снижается между 30 и 35%, 35 и 40%, 40 и 45%, 45 и 50%, 50 и 55%, 55 и 60%, 60 и 65%, 65 и 70%, 70 и 75%, 75 и 80%, 80 и 85%, 85 и 90%, 90 и 95%, или 95 и 99% от накопления амилоидов в отрицательном контроле.

26. Способ или композиция по любому из п.п. 20-25, отличающиеся тем, что накопление амилоидов снижается между 30 и 35%, 35 и 40%, 40 и 45%, 45 и 50%, 50 и 55%, 55 и 60%, 60 и 65%, 65 и 70%, 70 и 75%, 75 и 80%, 80 и 85%, 85 и 90%, 90 и 95%, или 95 и 99% от накопления амилоидов, зарегистрированного перед введением данной композиции.

27. Способ или композиция по любому из п.п. 1-5 или 8-26, отличающиеся тем, что композицию вводят или доставляют по меньшей мере дважды.

28. Способ или композиция по п. 27 формулы изобретения, отличающиеся тем, что композицию вводят или доставляют по меньшей мере три раза.

29. Способ или композиция по п. 27, отличающиеся тем, что композицию вводят или доставляют по меньшей мере четыре раза.

30. Способ или композиция по п. 27, отличающиеся тем, что композицию вводят или доставляют по меньшей мере пять, шесть, семь, восемь, девять или десять раз.

31. Способ или композиция по любому из п.п. 27-30, отличающиеся тем, что композицию вводят или доставляют с интервалом по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, или 15 дней.

32. Способ или композиция по любому из п.п. 27-30, отличающиеся тем, что композицию вводят или доставляют с интервалом по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, или 15 недель.

33. Способ или композиция по любому из п.п. 27-30, отличающиеся тем, что композицию вводят или доставляют с интервалом по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, или 15 месяцев.

34. Способ или композиция по любому из предшествующих пунктов, отличающиеся тем, что последовательность гена выбирают из SEQ ID №: 5-82.

35. Способ или композиция по любому из предшествующих пунктов, отличающиеся тем, что РНК гена является по меньшей мере частично комплементарной таргетной последовательности, присутствующей в гене TTR человека.

36. Способ или композиция по п. 35, отличающиеся тем, что таргетная последовательность находится в 1, 2, 3 или 4 экзоне гена TTR человека.

37. Способ или композиция по п. 35, отличающиеся тем, что таргетная последовательность находится в 1 экзоне гена TTR человека.

38. Способ или композиция по п. 35, отличающиеся тем, что таргетная последовательность находится во 2 экзоне гена TTR человека.

39. Способ или композиция по п. 35, отличающиеся тем, что таргетная последовательность находится в 3 экзоне гена TTR человека.

40. Способ или композиция по п. 35, отличающиеся тем, что таргетная последовательность находится в 4 экзоне гена TTR человека.

41. Способ или композиция по любому из п.п. 1-40, отличающиеся тем, что последовательность гена является комплементарной таргетной последовательности в положительной цепи TTR.

42. Способ или композиция по любому из п.п. 1-40, отличающиеся тем, что последовательность гена является комплементарной таргетной последовательности в отрицательной цепи TTR.

43. Способ или композиция по любому из п.п. 1-40, отличающиеся тем, что первая последовательность гена является комплементарной первой таргетной последовательности в положительной цепи гена TTR, при этом композиция дополнительно включает вторую последовательность гена, которая комплементарна второй таргетной последовательности в отрицательной цепи гена TTR.

44. Способ или композиция по любому из предшествующих пунктов, отличающиеся тем, что РНК гена включает crRNA, которая содержит последовательность гена и дополнительно содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID №: 126, отличающуюся тем, что нуклеотидная последовательность SEQ ID №: 126 следует за последовательностью гена на ее 3' конце.

45. Способ или композиция по любому из предшествующих пунктов, отличающиеся тем, что РНК гидом является двухцепочечная РНК гид (dgRNA).

46. Способ или композиция по п. 45, отличающиеся тем, что двухцепочечная РНК гид включает crRNA, которая содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID №: 126, отличающиеся тем, что нуклеотиды из SEQ ID №: 126 следуют за последовательностью гида на ее 3' конце, и trRNA.

47. Способ или композиция по любому из п.п. 1-43, отличающиеся тем, что РНК гид является одноцепочечным гидом (sgRNA).

48. Способ или композиция по п. 47, отличающиеся тем, что sgRNA включает последовательность гида, которая является образцом из SEQ ID №:3.

49. Способ или композиция по п. 47, отличающиеся тем, что sgRNA включает последовательность из SEQ ID №: 3.

50. Способ или композиция по п.п. 48 или 49, отличающиеся тем, что каждый N в SEQ ID №:3 является любым естественным или искусственным нуклеотидом, отличающиеся тем, что N формируют последовательность гида и эта последовательность гида нацеливает Cas9 на *TTR ген*.

51. Способ или композиция по любому из п.п. 47-50, отличающиеся тем, что sgRNA включает любую из последовательностей гида SEQ ID №: 5-82 и the нуклеотиды из SEQ ID №: 126.

52. Способ или композиция по любому из п.п. 47-50, отличающиеся тем, что sgRNA включает последовательность гида, которая является по меньшей мере на 99, 98, 97, 96, 95, 94, 93, 92, 91% или 90% идентичной последовательности, выбранной из SEQ ID №: 87-124.

53. Способ или композиция по п. 47, отличающиеся тем, что sgRNA включает последовательность, выбранную из SEQ ID №: 87-124.

54. Способ или композиция по любому из предшествующих пунктов, отличающиеся тем, что РНК гид включает по меньшей мере одну модификацию.

55. Способ или композиция по п. 54, отличающиеся тем, что по меньшей мере одна модификация включает 2'-О-метил (2'-O-Me) модифицированный нуклеотид.

56. Способ или композиция по п. 54 или 55, отличающиеся тем, что по меньшей мере одна модификация включает фосфоротиоатную (PS) связь между нуклеотидами.

57. Способ или композиция по любому из п.п. 54-56, отличающиеся тем, что по меньшей мере одна модификация включает 2'-фтор (2'-F) модифицированный нуклеотид.

58. Способ или композиция по любому из п.п. 54-57, отличающиеся тем, что по меньшей мере одна модификация включает один или более из первых пяти нуклеотидов на 5' конце.

59. Способ или композиция по любому из п.п. 54-58, отличающиеся тем, что по меньшей мере одна модификация включает один или более из последних пяти нуклеотидов на 3' конце.

60. Способ или композиция по любому из п.п. 54-59, отличающиеся тем, что по

меньшей мере одна модификация включает PS связи между первыми четырьмя нуклеотидами.

61. Способ или композиция по любому из п.п. 54-60, отличающиеся тем, что по меньшей мере одна модификация включает PS связи между последними четырьмя нуклеотидами.

62. Способ или композиция по любому из п.п. 54-61, отличающиеся тем, что по меньшей мере одна модификация включает 2'-O-Me модифицированные нуклеотиды первых трех нуклеотидов на 5' конце.

63. Способ или композиция по любому из п.п. 54-62, отличающиеся тем, что по меньшей мере одна модификация включает 2'-O-Me модифицированные нуклеотиды последних трех нуклеотидов на 3' конце.

64. Способ или композиция по любому из п.п. 54-63, отличающиеся тем, что, РНК гид включает модифицированные нуклеотиды из SEQ ID №: 3.

65. Способ или композиция по любому из п.п. 1-64, отличающиеся тем, что композиция дополнительно включает фармацевтически приемлемый наполнитель.

66. Способ или композиция по любому из п.п. 1-65, отличающиеся тем, что РНК гид связывается с липидной наночастицей (LNP).

67. Способ или композиция по п. 66, отличающиеся тем, что LNP содержит CCD липид.

68. Способ или композиция по п. 67, отличающиеся тем, что липидом CCD является липид А или липид В.

69. Способ или композиция п.п. 66-68, отличающиеся тем, что LNP содержит нейтральный липид.

70. Способ или композиция по п. 69, отличающиеся тем, что нейтральным липидом является DSPC.

71. Способ или композиция по любому из п.п. 66-70, отличающиеся тем, что LNP содержит липид хелпер.

72. Способ или композиция по п. 71, отличающиеся тем, что липидом хелпером является холестерин.

73. Способ или композиция по п.п. 66-72, отличающиеся тем, что LNP содержит липид «невидимку».

74. Способ или композиция по п. 73, отличающиеся тем, что липидом «невидимкой» является PEG2k-DMG.

75. Способ или композиция по любому из предшествующих пунктов, отличающиеся тем, что композиция дополнительно включает агент, связывающий РНК гид с ДНК.

76. Способ или композиция по любому из предшествующих пунктов, отличающиеся тем, что композиция дополнительно включает мРНК, которая кодирует агент, связывающий РНК гид с ДНК.

77. Способ или композиция по п.п. 75 или 76, отличающиеся тем, что агентом,

связывающим РНК гид с ДНК, является эндонуклеаза Cas.

78. Способ или композиция по п. 77, отличающиеся тем, что агентом, связывающим РНК гид с ДНК, является Cas 9.

79. Способ или композиция по любому из п.п. 75-78, отличающиеся тем, что агент, связывающий РНК гид с ДНК, является модифицированным.

80. Способ или композиция по любому из п.п. 75-79, отличающиеся тем, что агентом, связывающим РНК гид с ДНК, является никаза.

81. Способ или композиция по п.п. 79 или 80, отличающиеся тем, что модифицированный агент, связывающий РНК гид с ДНК, включает сигнал ядерной локализации (NLS).

82. Способ или композиция по любому из п.п. 75-81, отличающиеся тем, что агентом, связывающим РНК гид с ДНК, является Cas системы Типа-II CRISPR/Cas.

83. Способ или композиция по любому из предшествующих пунктов, отличающиеся тем, что композиция является фармацевтическим составом и дополнительно включает фармацевтически приемлемый носитель.

84. Способ или композиция по любому из п.п. 1-5 или 8-83, отличающиеся тем, что композиция снижает или предотвращает накопление амилоидов или амилоидных фибрилл, содержащих TTR.

85. Способ или композиция по п. 84, отличающиеся тем, что амилоиды или амилоидные фибриллы накапливаются в нервах, сердце или желудочно-кишечном тракте.

86. Способ или композиция по любому из п.п. 1-5 или 8-83, отличающиеся тем, что негомологичное соединение концов (NHEJ) приводит к мутации при репарации DSB в гене TTR.

87. Способ или композиция по п. 86, отличающиеся тем, что NHEJ приводит к делеции или инсерции нуклеотида(ов) при репарации DSB в гене TTR.

88. Способ или композиция по п. 87, отличающиеся тем, что делеции или инсерции нуклеотида(ов) индуцируют сдвиг рамки или нонсенс мутацию в гене TTR.

89. Способ или композиция по п. 87, отличающиеся тем, сдвиг рамки или нонсенс мутация в гене TTR, индуцируется по меньшей мере у 50% клеток печени.

90. Способ или композиция по п. 89, отличающиеся тем, что сдвиг рамки или нонсенс мутация являются индуцированными в гене TTR у 50%-60%, 60%-70%, 70% или 80%, 80%-90%, 90- 95%, 95%-99%, или 99%-100% клеток печени.

91. Способ или композиция по любому из п.п. 87-90, отличающиеся тем, что делеции или инсерции нуклеотида(ов) выявляются в гене TTR по меньшей мере, в 50 или более раз чаще, по сравнению с нетаргетными сайтами.

92. Способ или композиция по п. 91, отличающиеся тем, что делеции или инсерции нуклеотида(ов) выявляют в гене TTR от 50 до 150, от 150 до 500, от 500 до 1500, от 1500 до 5000, от 5000 до 15000, от 15000 до 30000, или от 30000 до 60000 раз чаще, по сравнению с таковыми в нетаргетных сайтах.

93. Способ или композиция по любому из п.п. 87-92, отличающиеся тем, что

делеции или инсерции нуклеотида(ов) выявляют в менее чем, или в количестве равном 3, 2, 1 или 0 нетаргетных сайтов в первичных гепатоцитах человека, необязательно отличающихся тем, что нетаргетный(е) сайт(ы) не выявляют в участке, кодирующем белок в геноме первичных гепатоцитов человека.

94. Способ или композиция по п. 93, отличающиеся тем, что количество делеций или инсерций нуклеотида(ов), выявляемых в нетаргетных сайтах первичных гепатоцитов человека меньше, чем количество нетаргетных сайтов, в которых выявляют делеции или инсерции нуклеотида(ов) в клетках с высокой экспрессией Cas9, необязательно отличающихся тем, что нетаргетный(е) сайт(ы) не выявляются в участке, кодирующем белок в геноме первичных гепатоцитов человека.

95. Способ или композиция по п. 94, отличающиеся тем, что клетки с высокой экспрессией Cas9 являются клетками НЕК293, которые стабильно экспрессируют Cas9.

96. Способ или композиция по любому из п.п. 93-95, отличающиеся тем, что количество нетаргетных сайтов в первичных гепатоцитах человека определено при анализе геномной ДНК из первичных гепатоцитов человека, которые трансфицированы *in vitro* мРНК Cas9 и РНК гидом, при этом нетаргетный(е) сайт(ы) необязательно не выявляются в участке, кодирующем белок в геноме первичных гепатоцитов человека.

97. Способ или композиция по любому из п.п. 93-95, отличающиеся тем, что количество нетаргетных сайтов в первичных гепатоцитах человека определено с помощью количественного анализа инсерций олигонуклеотидов, включая анализ геномной ДНК из первичных гепатоцитов человека, которые трансфицированы *in vitro* мРНК Cas9, РНК гидом и донорским олигонуклеотидом, при этом в нетаргетном(ых) сайте(ах) необязательно не выявляется участок, кодирующий белок в геноме первичных гепатоцитов человека.

98. Способ или композиция по любому из п.п. 1-43 или 47-97, отличающиеся тем, что последовательностью РНК гида является:

- 1) SEQ ID №: 92 или 104;
- 2) SEQ ID №: 87, 89, 96, или 113;
- 3) SEQ ID №: 100, 102, 106, 111, или 112; или
- 4) SEQ ID №: 88, 90, 91, 93, 94, 95, 97, 101, 103, 108, или 109,

при этом РНК гид может не образовывать делеций/ инсерций на участке(ах) нетаргетных сайтов, которые появляются в участке, кодирующем белок в геноме первичных гепатоцитов человека.

99. Способ или композиция по любому из п.п. 1-5 или 8-98, отличающиеся тем, что введение композиции снижает уровни TTR у субъекта.

100. Способ или композиция по п. 99, отличающиеся тем, что уровни TTR снижаются по меньшей мере на 50%.

101. Способ или композиция по п. 100, отличающиеся тем, что уровни TTR снижаются на 50%-60%, 60%-70%, 70% или 80%, 80%-90%, 90-95%, 95%-99% или 99%-100%.

102. Способ или композиция по п.п. 100 или 101, отличающиеся тем, что уровни TTR измерены в сыворотке, плазме, крови, спинномозговой жидкости или мокроте.

103. Способ или композиция по п.п. 100 или 101, отличающиеся тем, что уровни TTR измерены в печени, хороидном сплетении и/или сетчатке.

104. Способ или композиция по любому из п.п. 99-103, отличающиеся тем, что уровни TTR измерены методом твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA).

105. Способ или композиция по любому из п.п. 1-5 или 8-104, отличающиеся тем, что у субъекта диагностирован ATTR.

106. Способ или композиция по любому из п.п. 1-5 или 8-105, отличающиеся тем, что субъектом является человек.

107. Способ или композиция по п.п. 105 или 106, отличающиеся тем, что у субъекта диагностируют «дикий тип» ATTRwt.

108. Способ или композиция по п.п. 105 или 106, отличающиеся тем, что у субъекта диагностируют наследственный ATTR.

109. Способ или композиция по любому из п.п. 1-5, 8-106, или 108, отличающиеся тем, что субъект имеет семейный анамнез ATTR.

110. Способ или композиция по любому из п.п. 1-5, 8-106 или 108-109, отличающиеся тем, что у субъекта в анамнезе есть семейная амилоидная полинейропатия.

111. Способ или композиция по любому из п.п. 1-5 или 8-110, отличающиеся тем, что у субъекта исключительно или преимущественно неврологические симптомы ATTR.

112. Способ или композиция по любому из п.п. 1-5 или 8-110, отличающиеся тем, что у субъекта в анамнезе есть семейная амилоидная кардиомиопатия.

113. Способ или композиция по любому из п.п. 1-5, 8-109 или 112, отличающиеся тем, что у субъекта исключительно или преимущественно кардиальные симптомы ATTR.

114. Способ или композиция по любому из п.п. 1-5 или 8-113, отличающиеся тем, что у субъекта экспрессируется TTR с V30 мутацией.

115. Способ или композиция по п. 114, отличающиеся тем, что V30 мутацией является V30A, V30G, V30L, или V30M.

116. Способ или композиция по любому из п.п. 1-5 или 8-113, отличающиеся тем, что у субъекта экспрессируется TTR с T60 мутацией.

117. Способ или композиция по п. 116, отличающиеся тем, что T60 мутацией является T60A.

118. Способ или композиция по любому из п.п. 1-5 или 8-113, отличающиеся тем, что у субъекта экспрессируют TTR с V122 мутацией.

119. Способ или композиция по п. 118, отличающиеся тем, что V122 мутацией является V122A, V122I или V122(-).

120. Способ или композиция по любому из п.п. 1-5 или 8-119, отличающиеся тем, что субъекта экспрессируют дикий тип TTR.

121. Способ или композиция по любому из п.п. 1-5, 8-107 или 120, отличающиеся тем, что у субъекта не экспрессируется TTR с мутациями V30, T60 или V122.

122. Способ или композиция по любому из п.п. 1-5, 8-107 или 120-121, отличающиеся тем, что у субъекта не экспрессируется TTR с патологическими мутациями.

123. Способ или композиция по п. 121, отличающиеся тем, что субъект является гомозиготным по *TTR* «дикого типа».

124. Способ или композиция по любому из п.п. 1-5 или 8-123, отличающиеся тем, что после ее введения, у субъекта отмечают улучшение, стабилизация или облегчение симптомов сенсомоторной нейропатии.

125. Способ или композиция по п. 124, отличающиеся тем, что улучшение, стабилизация или облегчение симптомов сенсомоторной нейропатии диагностировано с помощью электромиограммы, тестов на нервную проводимость, или об облегчении симптомов сообщено пациентом.

126. Способ или композиция по любому из п.п. 1-5 или 8-125, отличающиеся тем, что после введения, у субъекта отмечается улучшение, стабилизация или облегчение симптомов застойной сердечной недостаточности.

127. Способ или композиция по п. 126, отличающиеся тем, что улучшение, стабилизация или облегчение симптомов застойной сердечной недостаточности измерено с помощью сердечных биомаркеров, тестов легочной функции, рентгенографией или электрокардиографией.

128. Способ или композиция по любому из п.п. 1-5 или 8-127, отличающиеся тем, что композиция или фармакологический состав вводят с помощью вирусного вектора.

129. Способ или композиция по любому из п.п. 1-5 или 8-127, отличающиеся тем, что композиция или фармакологический состав доставляется с помощью липидных наночастиц.

130. Способ или композиция по любому из п.п. 1-5 или 8-129, отличающиеся тем, что у субъекта тестированы специфические мутации в гене TTR перед введением состава или фармацевтической формы.

131. Способ или композиция по любому из п.п. 1-130, отличающиеся тем, что последовательностью, выбранной из SEQ ID №: 5-82 является SEQ ID №: 5.

132. Способ или композиция по любому из п.п. 1-130, отличающиеся тем, что последовательностью, выбранной из SEQ ID №: 5-82 является SEQ ID №: 6.

133. Способ или композиция по любому из п.п. 1-130, отличающиеся тем, что последовательностью, выбранной из SEQ ID №: 5-82 является SEQ ID №: 7.

134. Способ или композиция по любому из п.п. 1-130, отличающиеся тем, что последовательностью, выбранной из SEQ ID №: 5-82 является SEQ ID №: 8.

135. Способ или композиция по любому из п.п. 1-130, отличающиеся тем, что последовательностью, выбранной из SEQ ID №: 5-82 является SEQ ID №: 9.

136. Способ или композиция по любому из п.п. 1-130, отличающиеся тем, что последовательностью, выбранной из SEQ ID №: 5-82 является SEQ ID №: 10.

137. Способ или композиция по любому из п.п. 1-130, отличающиеся тем, что

последовательностью, выбранной из SEQ ID №: 5-82 является SEQ ID №: 71.

198. Способ или композиция по любому из п.п. 1-130, отличающиеся тем, что последовательностью, выбранной из SEQ ID №: 5-82 является SEQ ID №: 72.

199. Способ или композиция по любому из п.п. 1-130, отличающиеся тем, что последовательностью, выбранной из SEQ ID №: 5-82 является SEQ ID №: 73.

200. Способ или композиция по любому из п.п. 1-130, отличающиеся тем, что последовательностью, выбранной из SEQ ID №: 5-82 является SEQ ID №: 74.

201. Способ или композиция по любому из п.п. 1-130, отличающиеся тем, что последовательностью, выбранной из SEQ ID №: 5-82 является SEQ ID №: 75.

202. Способ или композиция по любому из п.п. 1-130, отличающиеся тем, что последовательностью, выбранной из SEQ ID №: 5-82 является SEQ ID №: 76.

203. Способ или композиция по любому из п.п. 1-130, отличающиеся тем, что последовательностью, выбранной из SEQ ID №: 5-82 является SEQ ID №: 77.

204. Способ или композиция по любому из п.п. 1-130, отличающиеся тем, что последовательностью, выбранной из SEQ ID №: 5-82 является SEQ ID №: 78.

205. Способ или композиция по любому из п.п.1-130, отличающиеся тем, что последовательностью, выбранной из SEQ ID №: 5-82 является SEQ ID №: 79.

206. Способ или композиция по любому из п.п. 1-130, отличающиеся тем, что последовательностью, выбранной из SEQ ID №: 5-82 является SEQ ID №: 80.

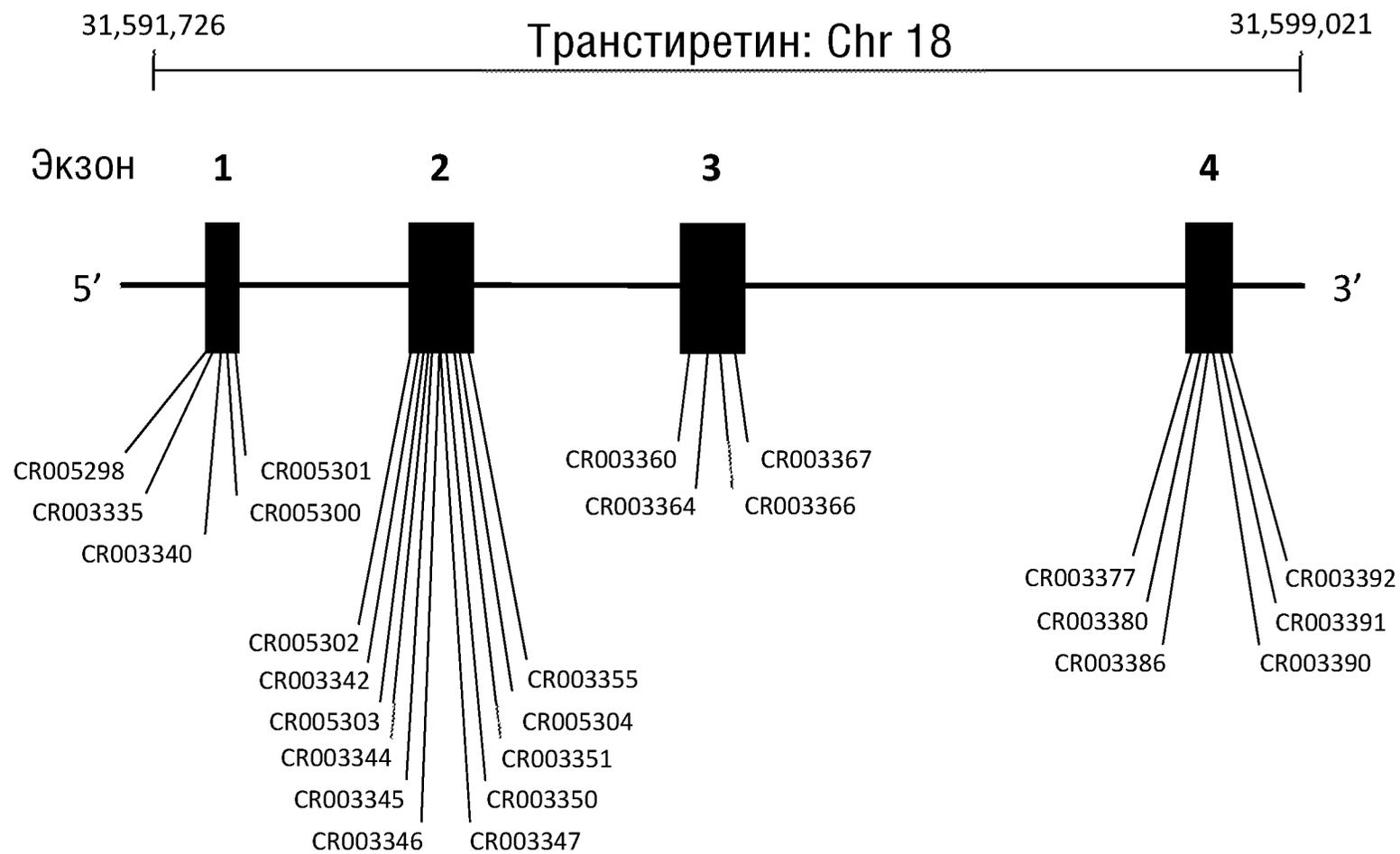
207. Способ или композиция по любому из п.п. 1-130, отличающиеся тем, что последовательностью, выбранной из SEQ ID №: 5-82 является SEQ ID №: 81.

208. Способ или композиция по любому из п.п. 1-130, отличающиеся тем, что последовательностью, выбранной из SEQ ID №: 5-82 является SEQ ID №: 82.

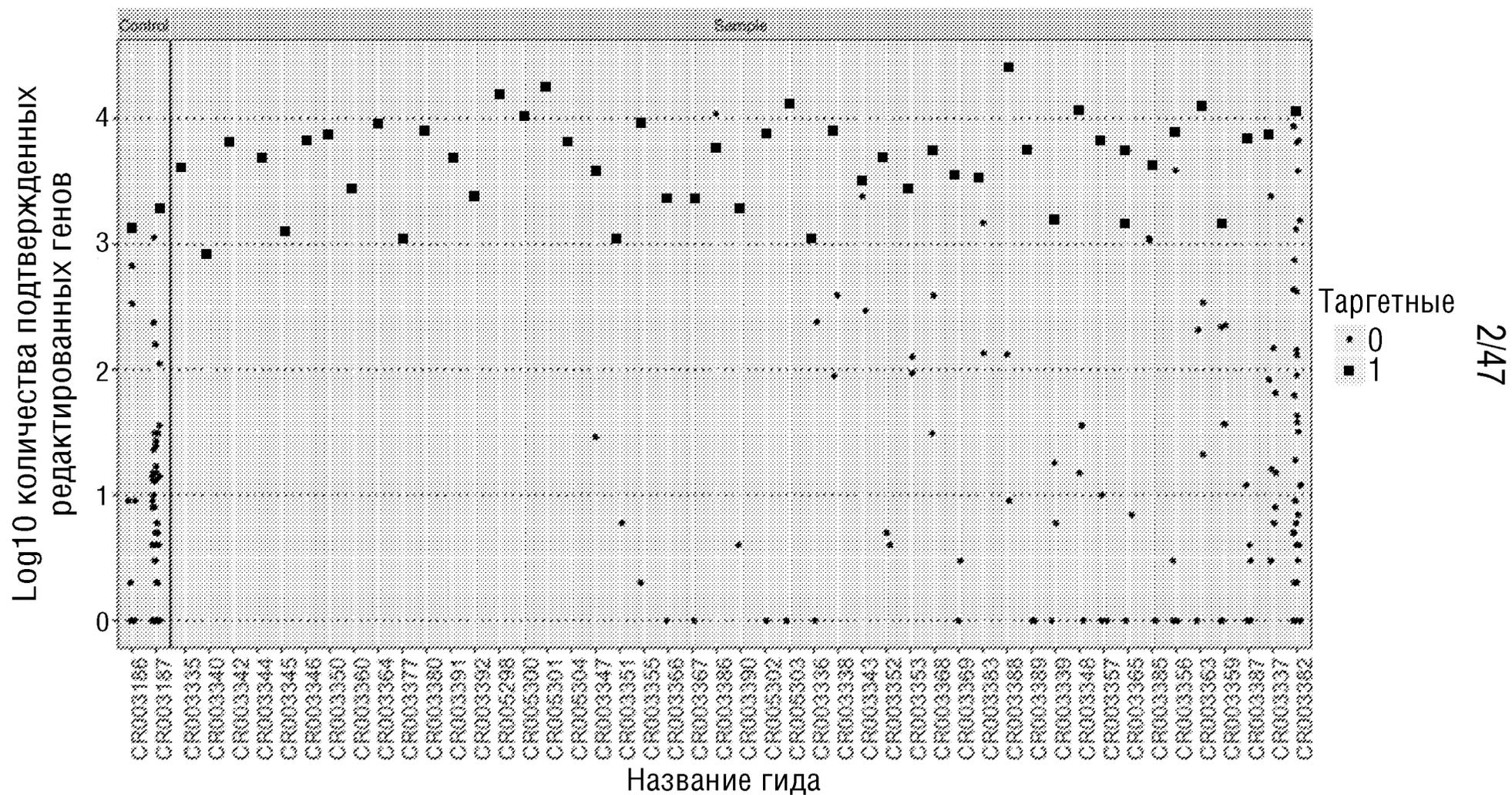
209. Использование композиции или фармацевтической формы по любому из пунктов 6-208 формулы изобретения для подготовки лекарственного средства для лечения субъекта, которым является человек, с диагностированным ATTR.

По доверенности

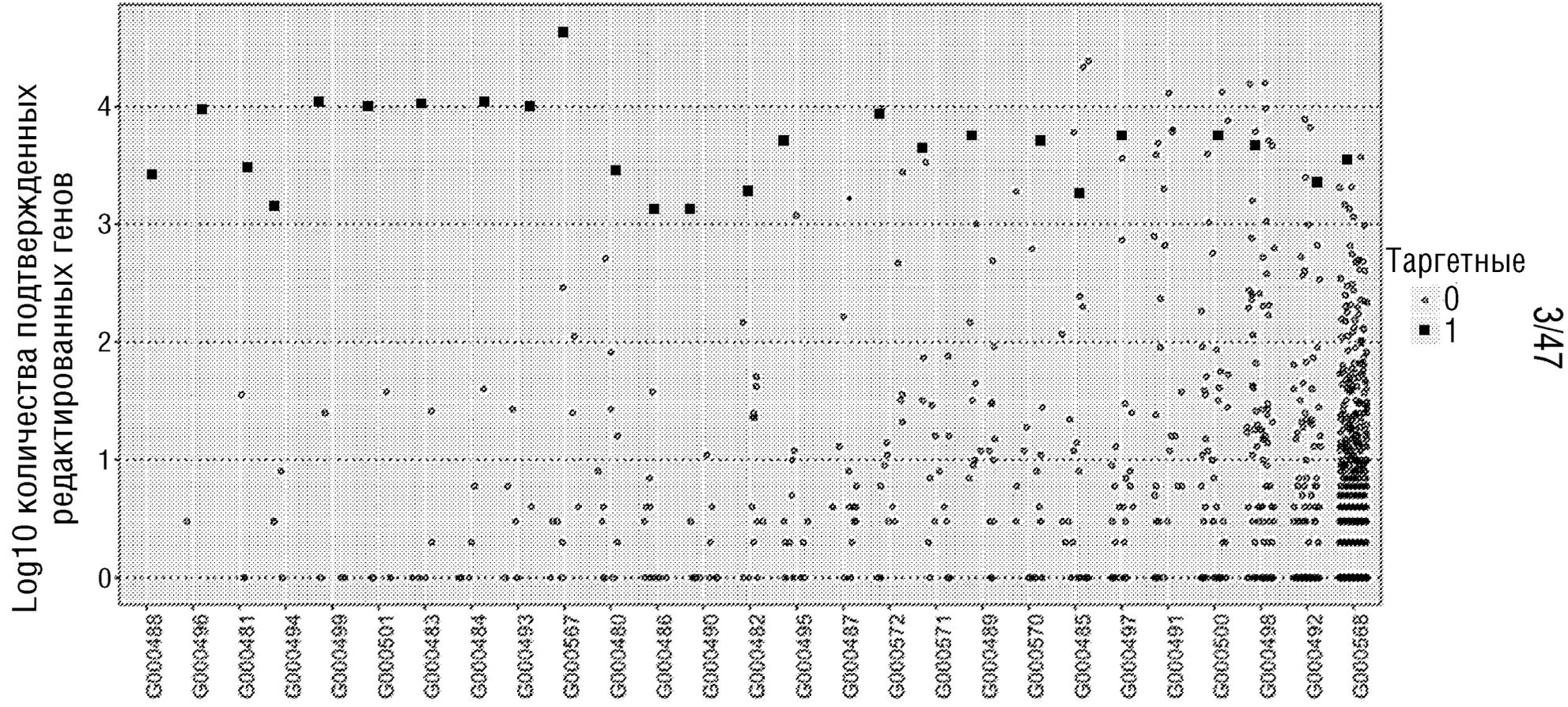
ФИГ.1



ФИГ.2

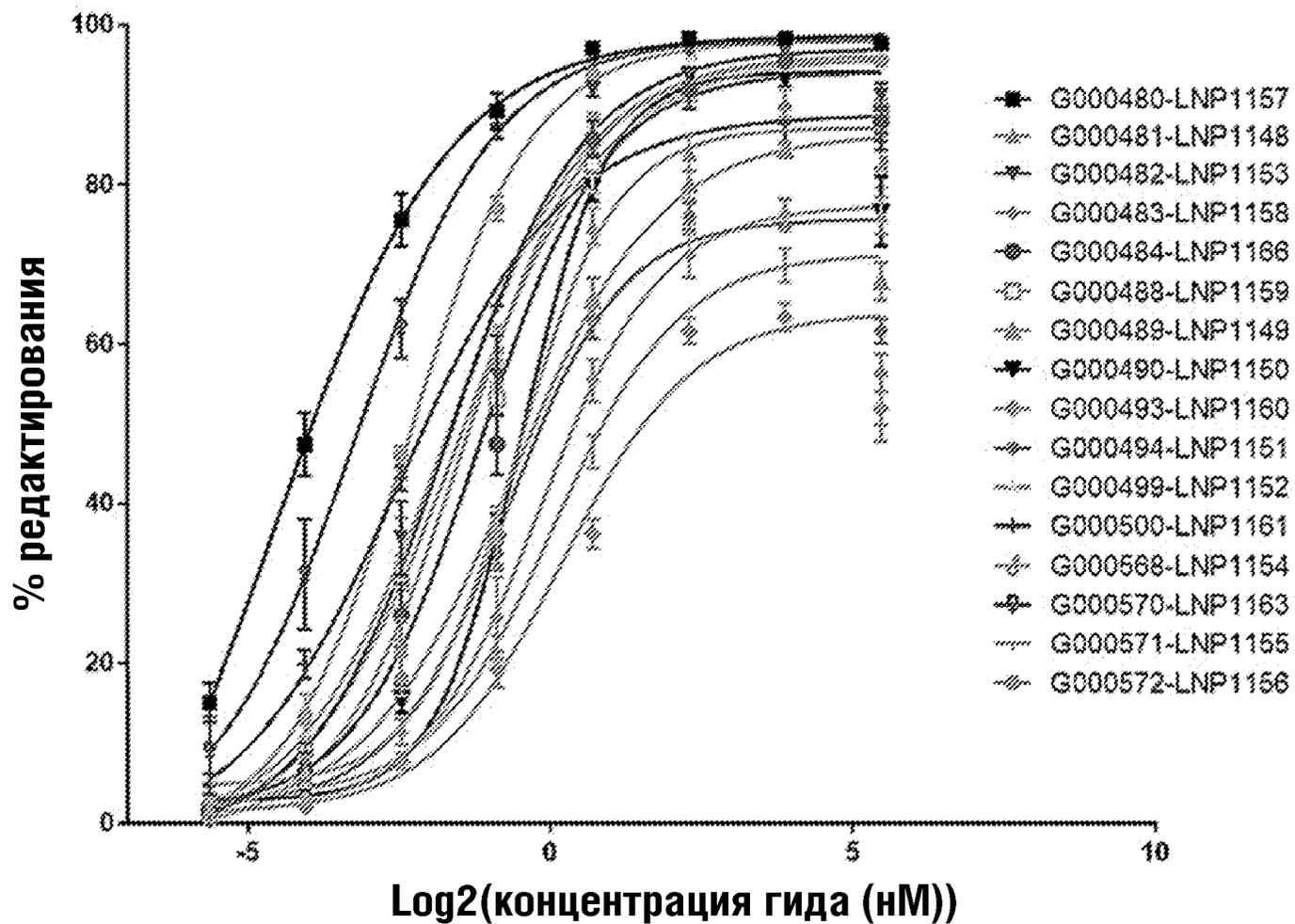


ФИГ.3



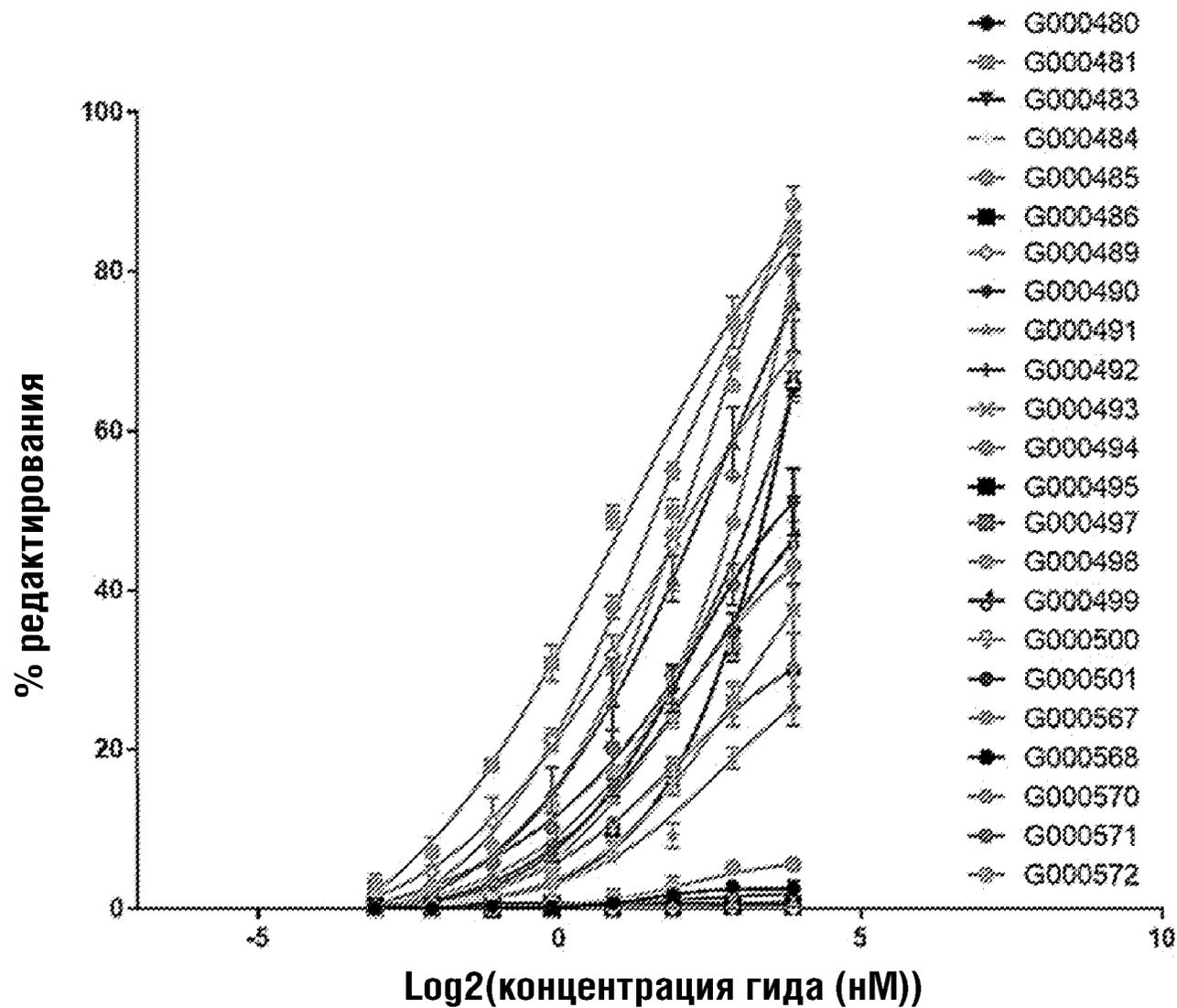
ФИГ.4

DRC сформированных LNP, включающих TTR с одноцепочечной РНК гидом (sgRNA) в первичных гепатоцитах человека



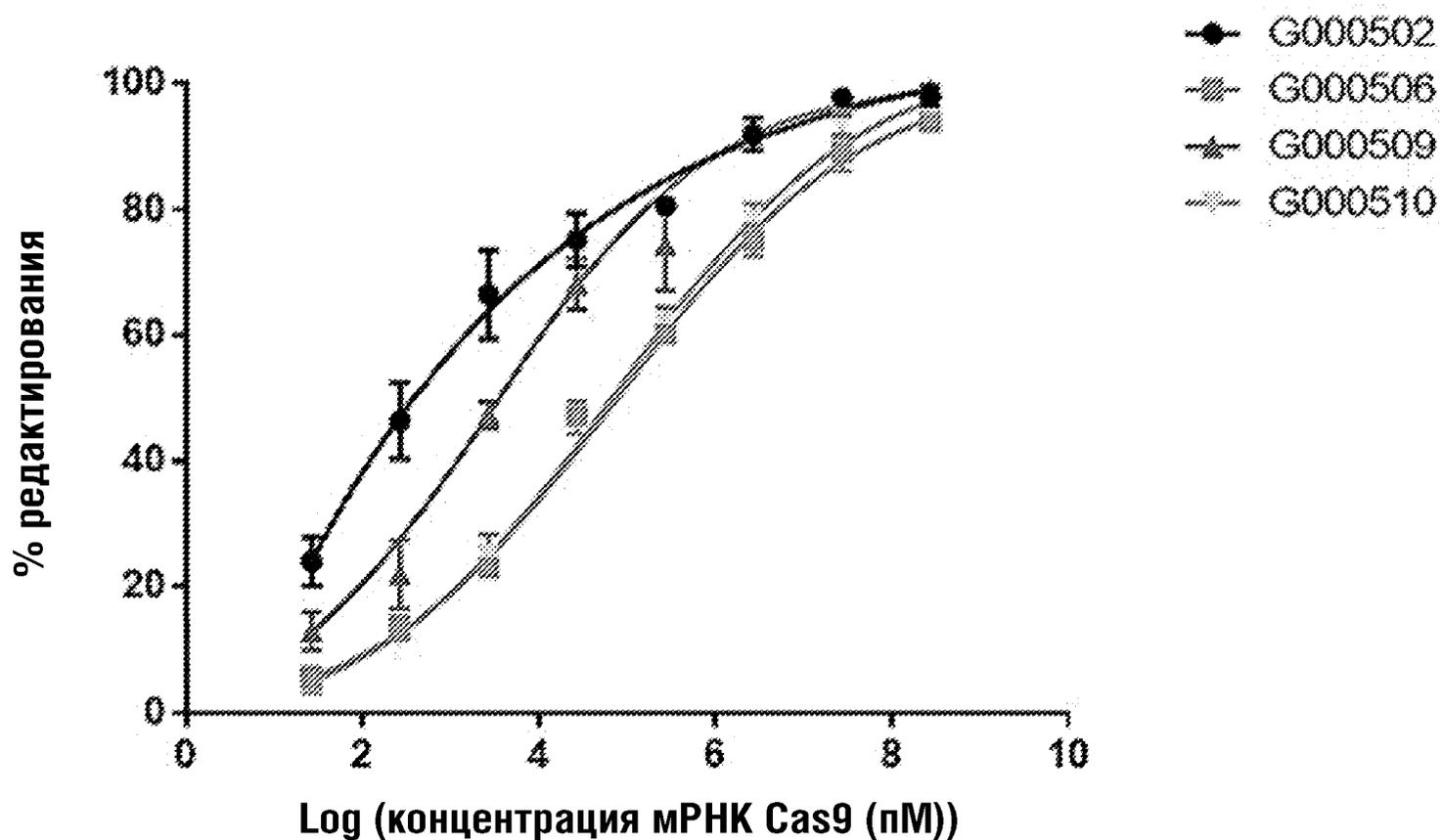
ФИГ.5

DRC сформированных LNP, включающих TTR с одноцепочечной РНК гидом (sgRNA) в первичных гепатоцитах обезьяны

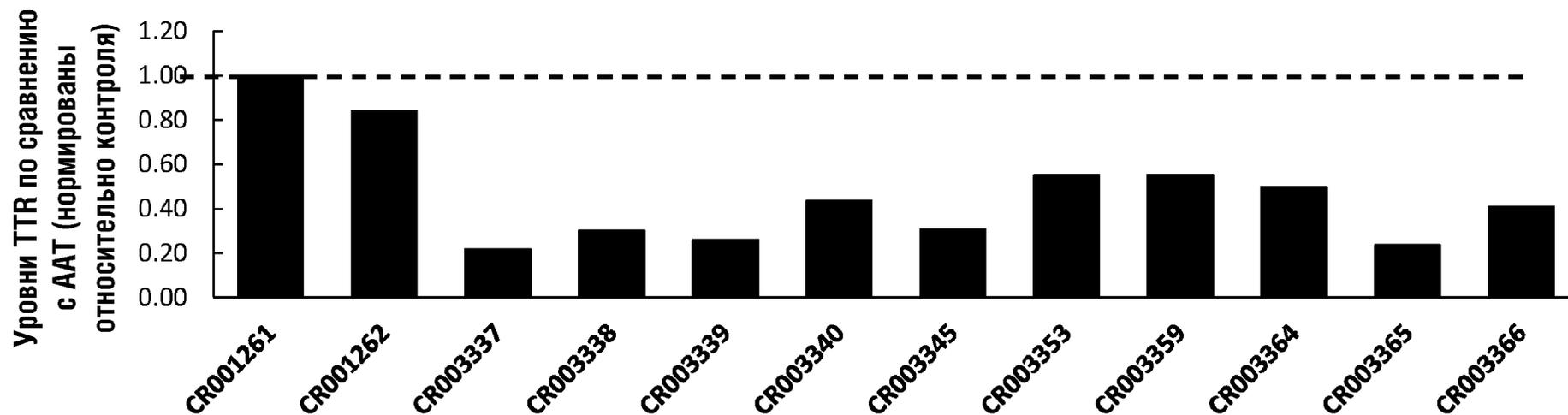
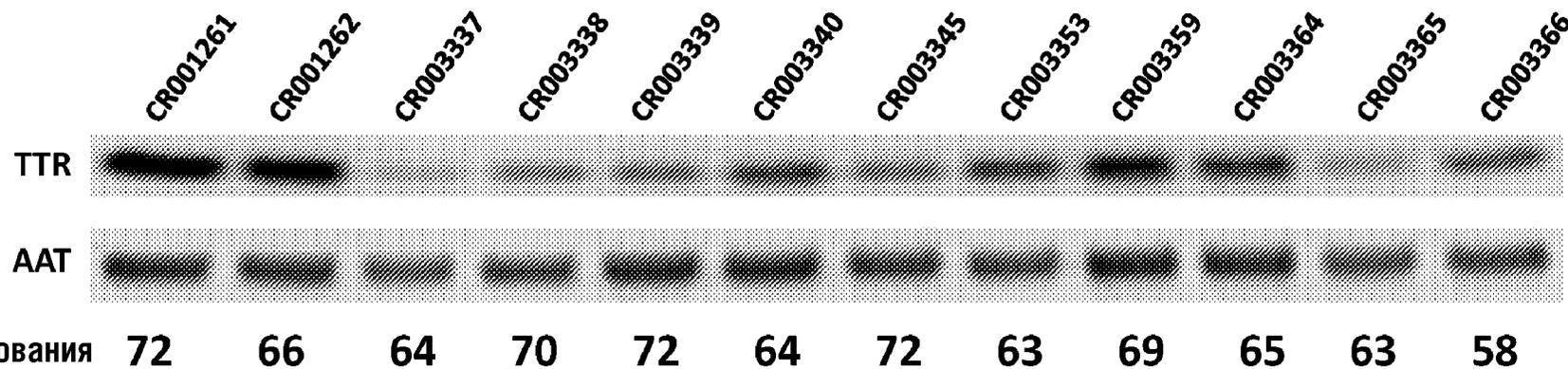


ФИГ.6

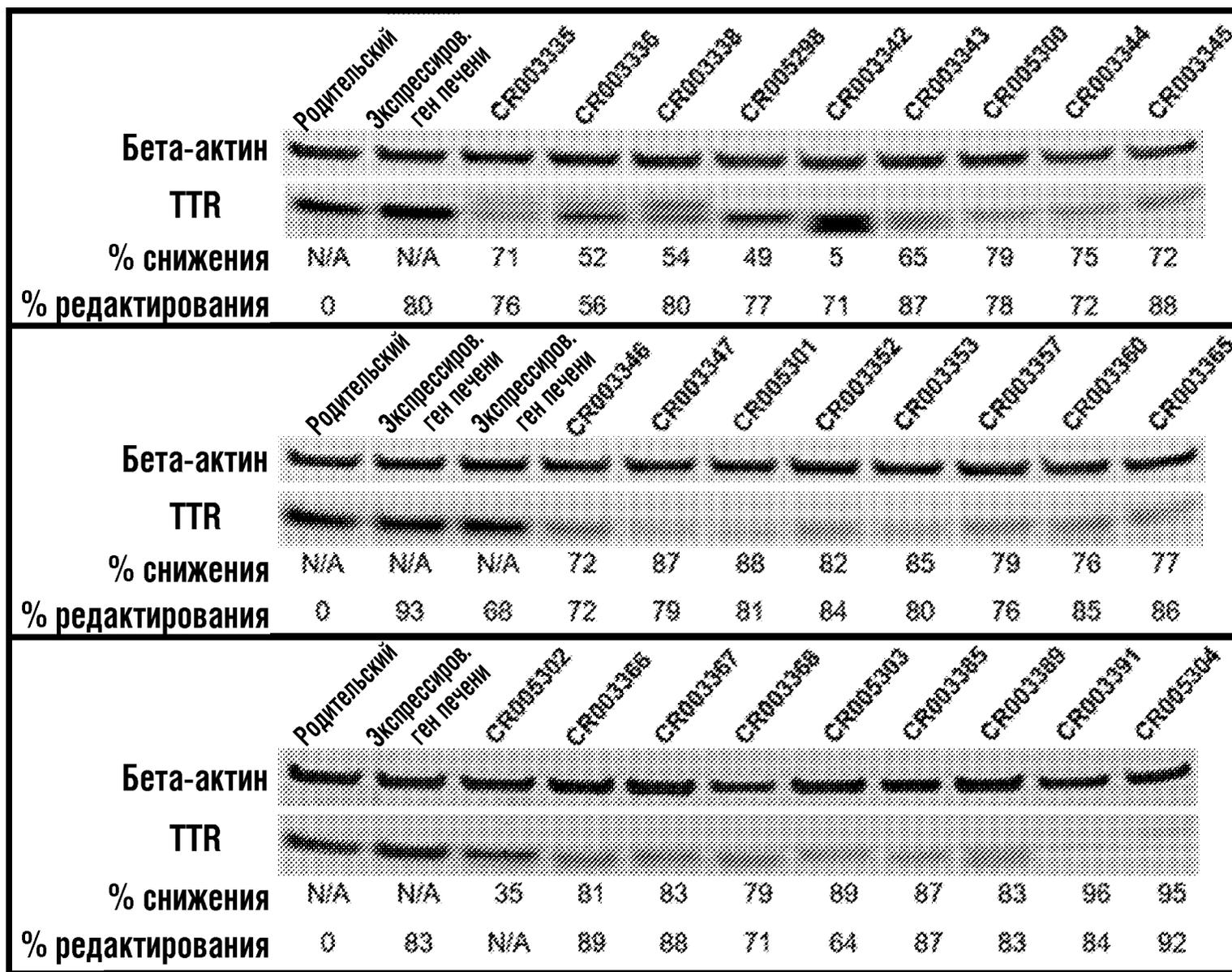
Кривая зависимости «доза – эффект» специфических LNP для TTR обезьяны в первичных гепатоцитах обезьяны



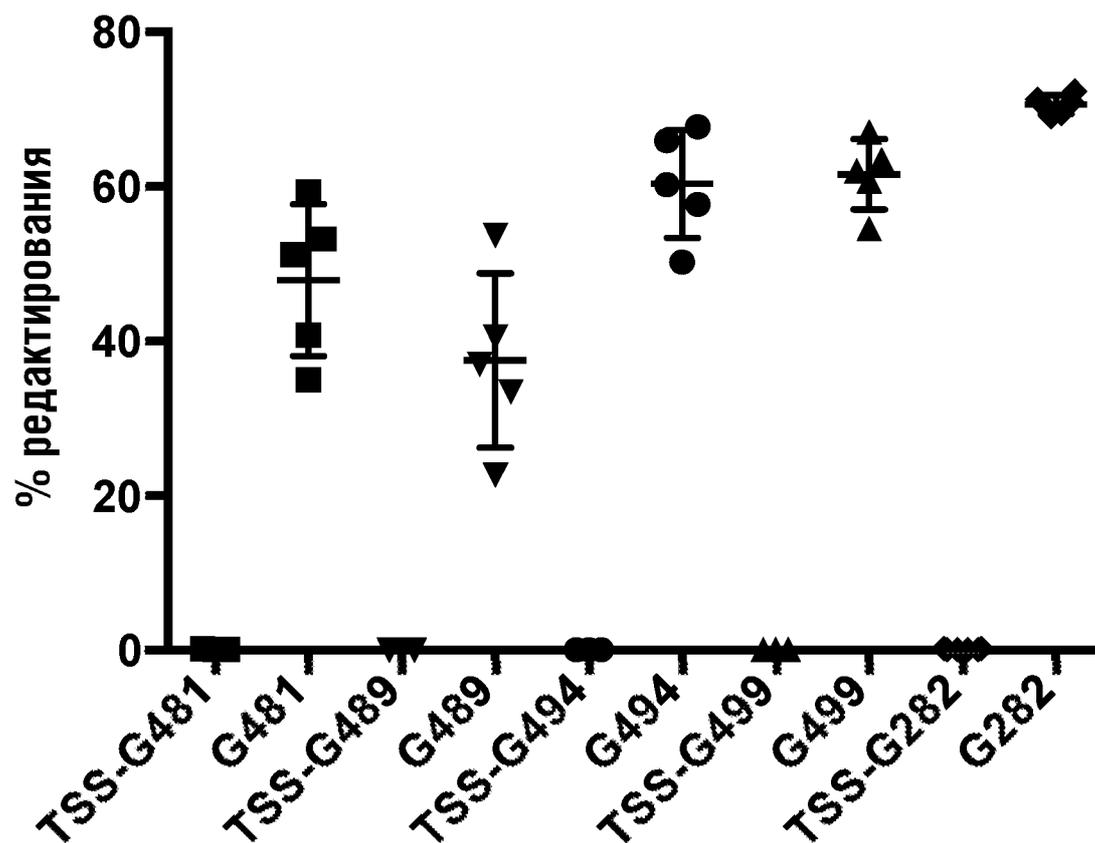
ФИГ.7



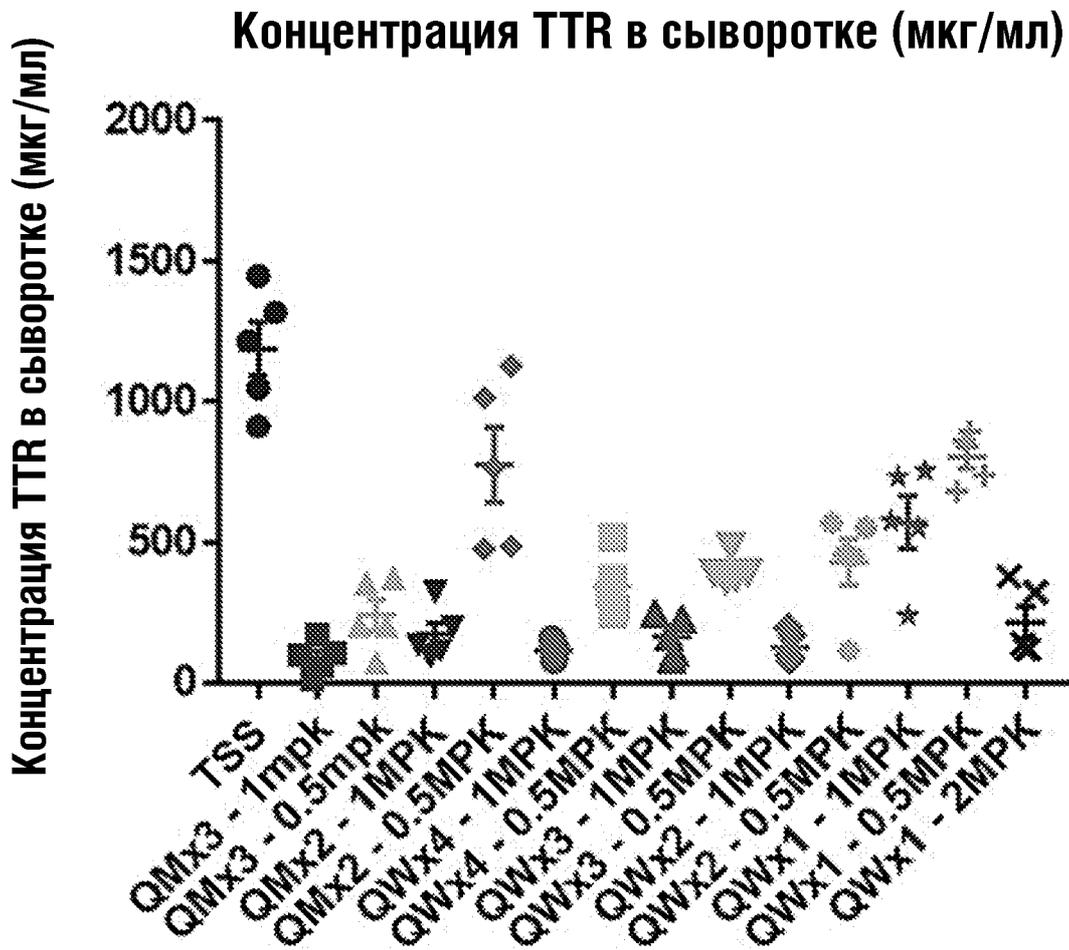
ФИГ.8



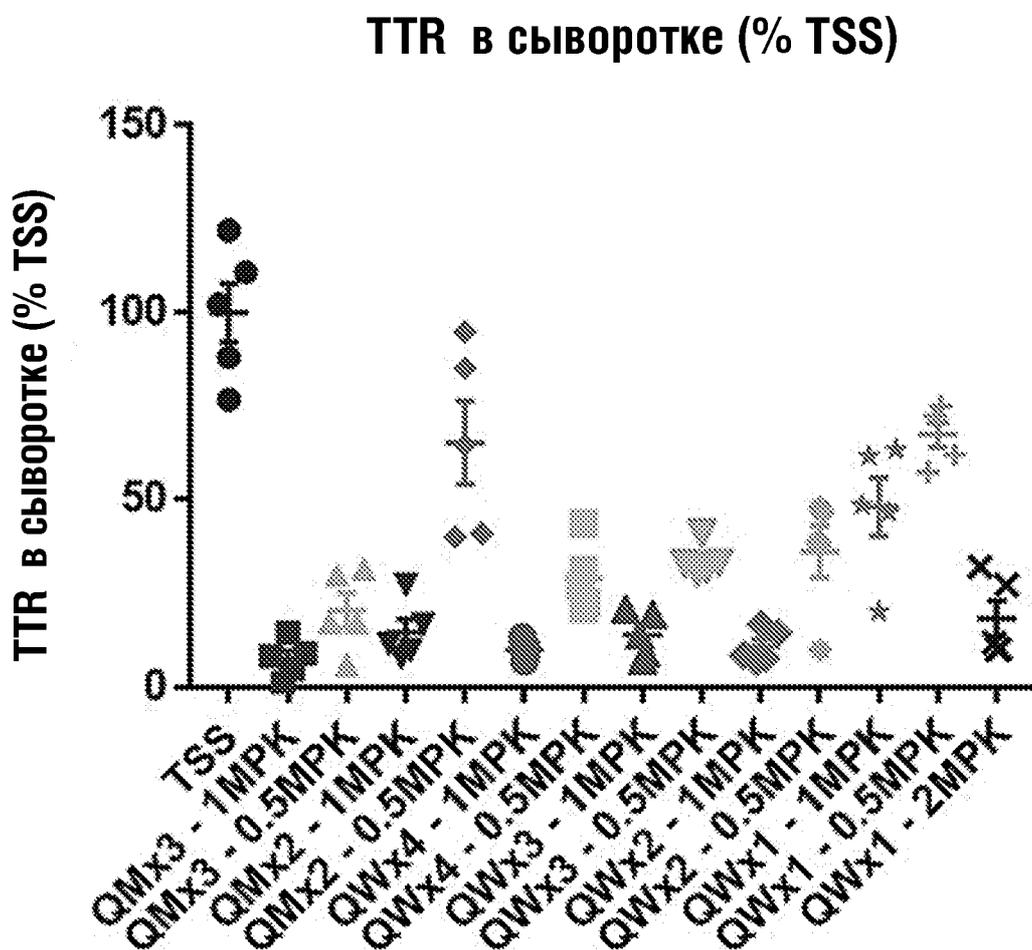
ФИГ.9



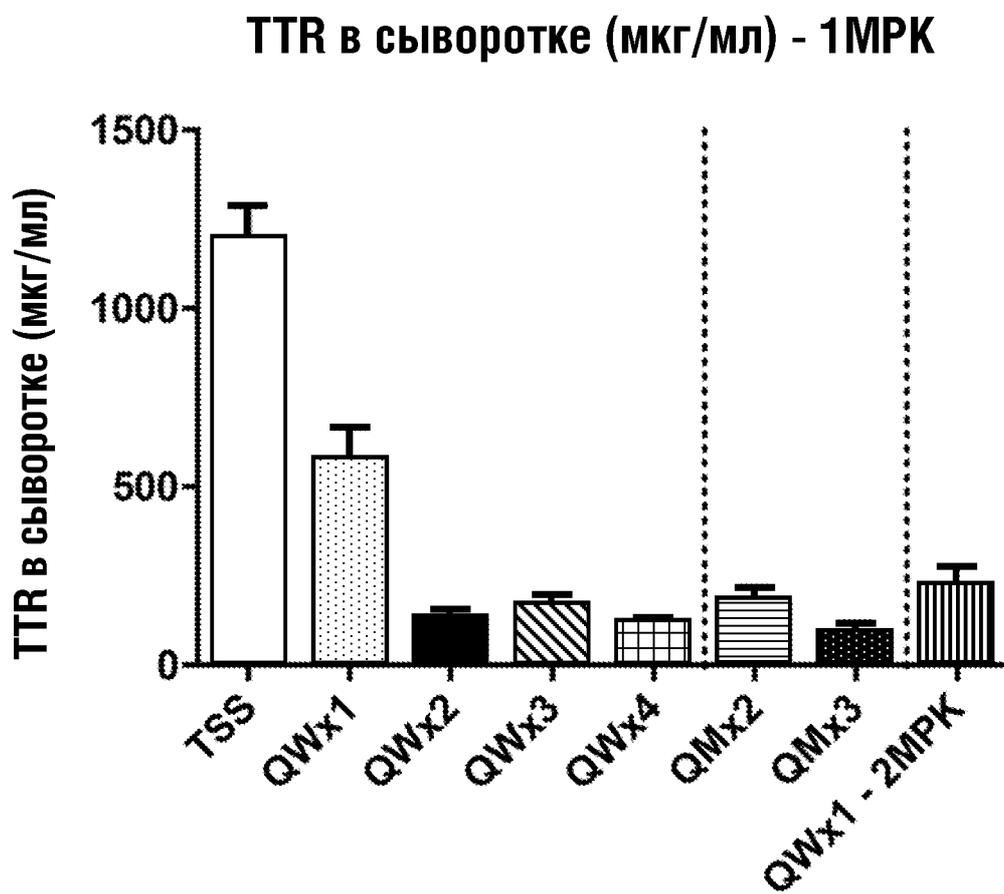
ФИГ.10А



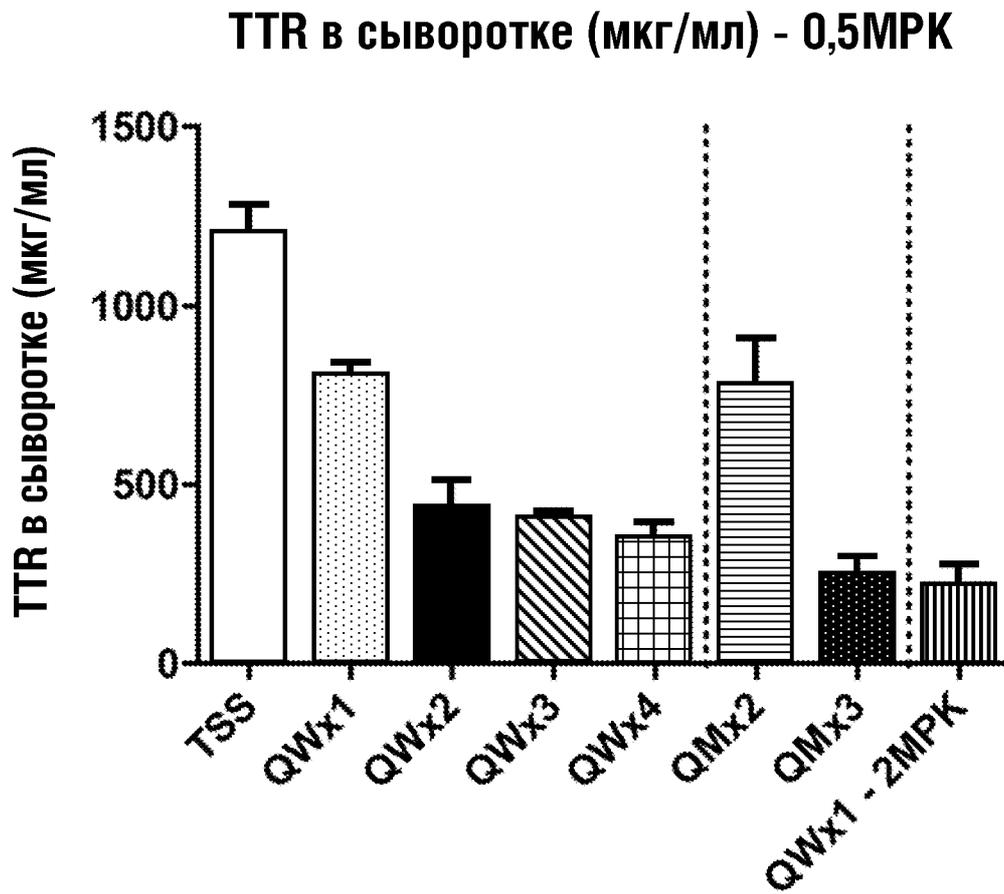
ФИГ.10В



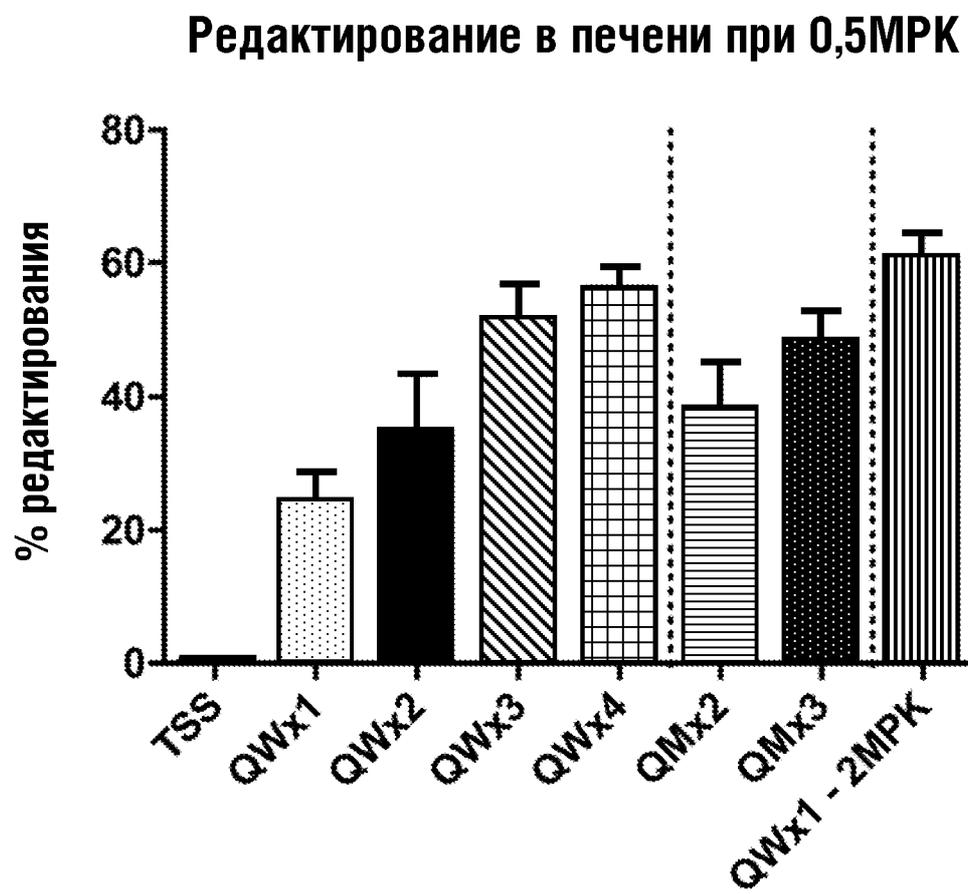
ФИГ.11А



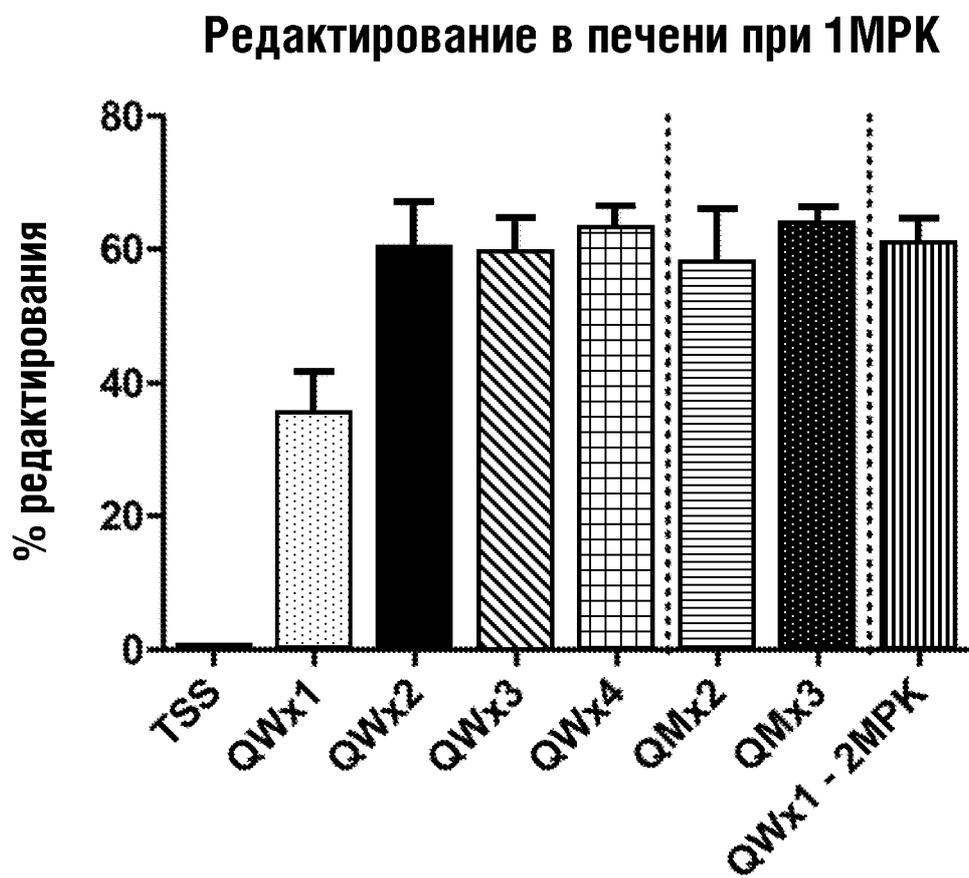
ФИГ.11В



ФИГ.12А



ФИГ.12В



ФИГ.12С



ФИГ.13



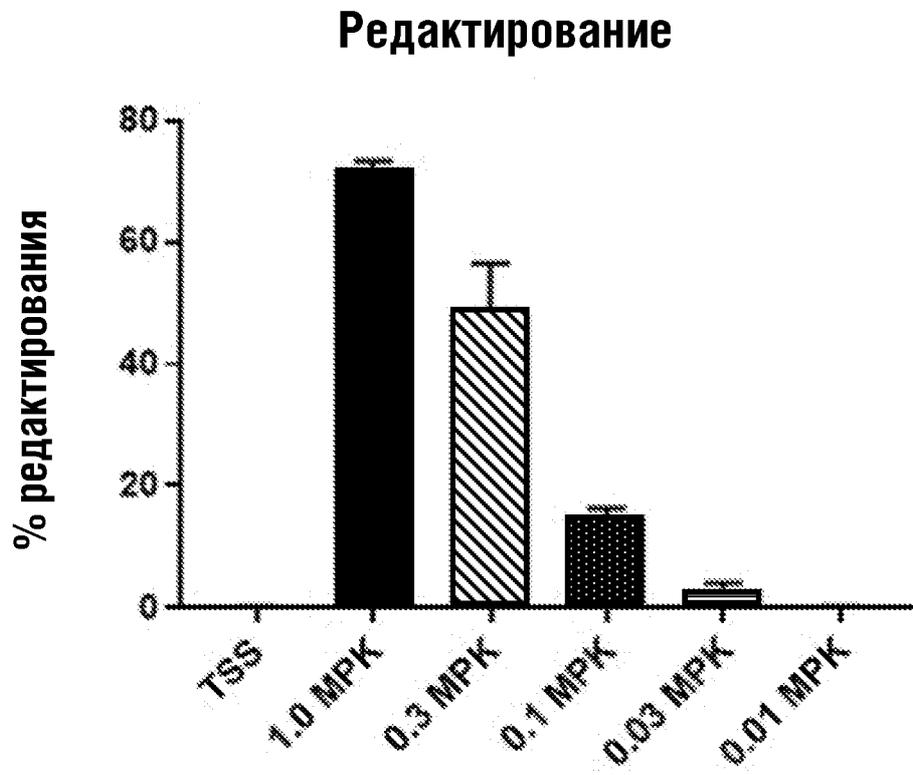
ФИГ.14А



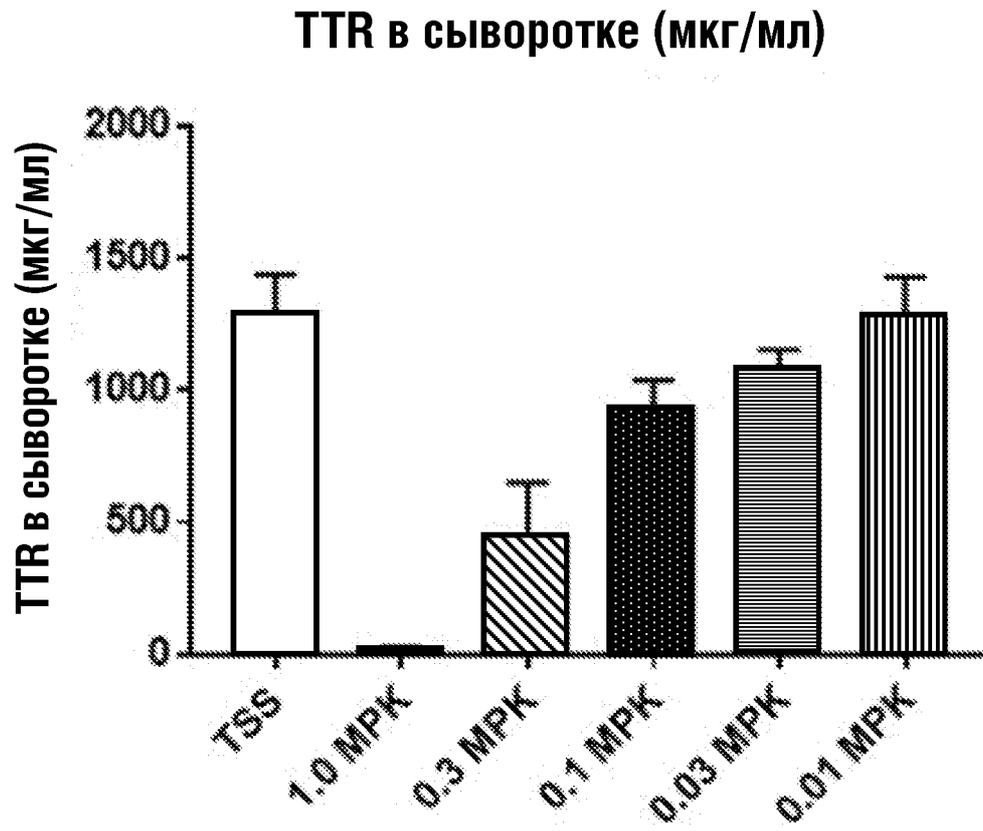
ФИГ.14В



ФИГ.15А

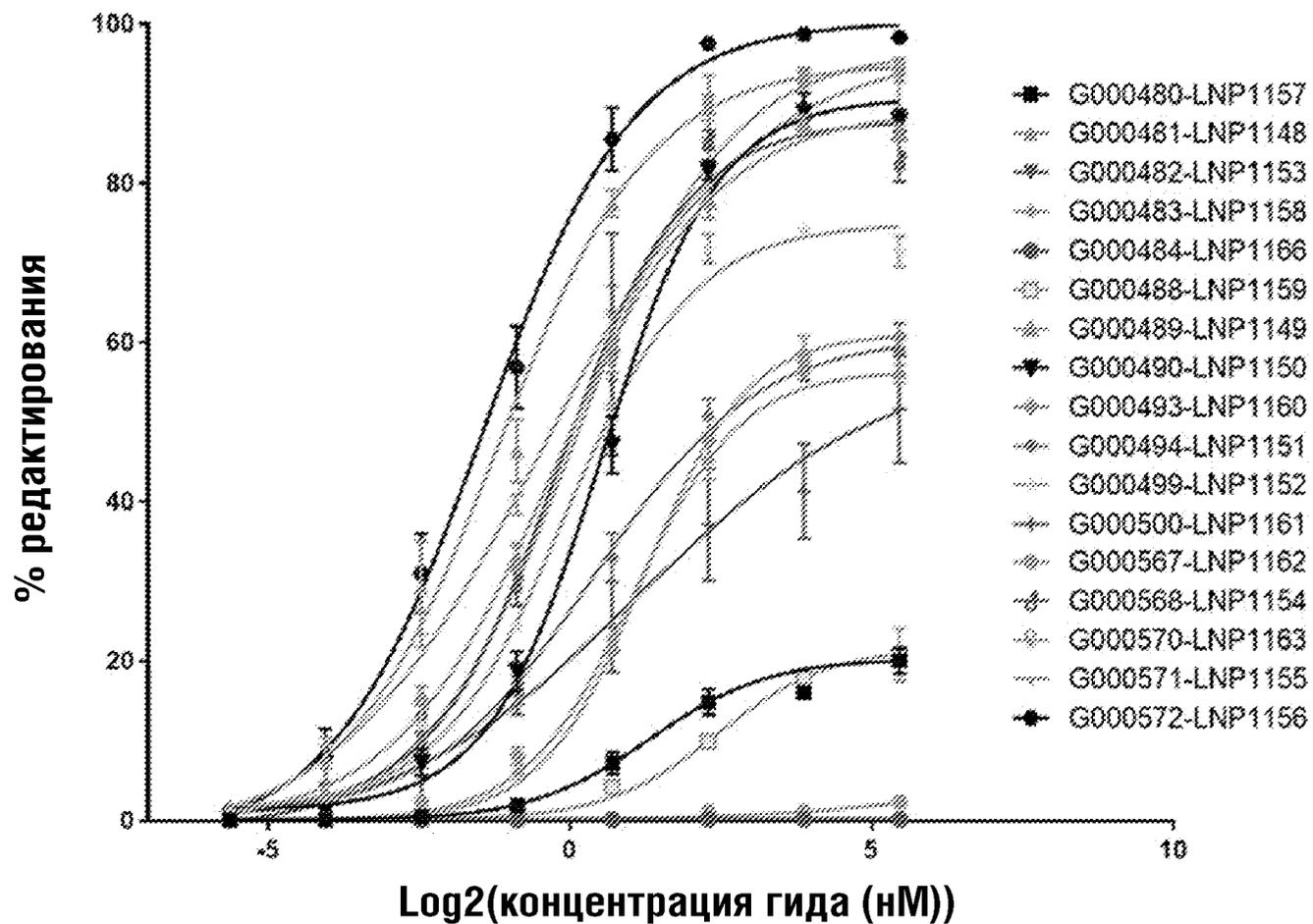


ФИГ.15В



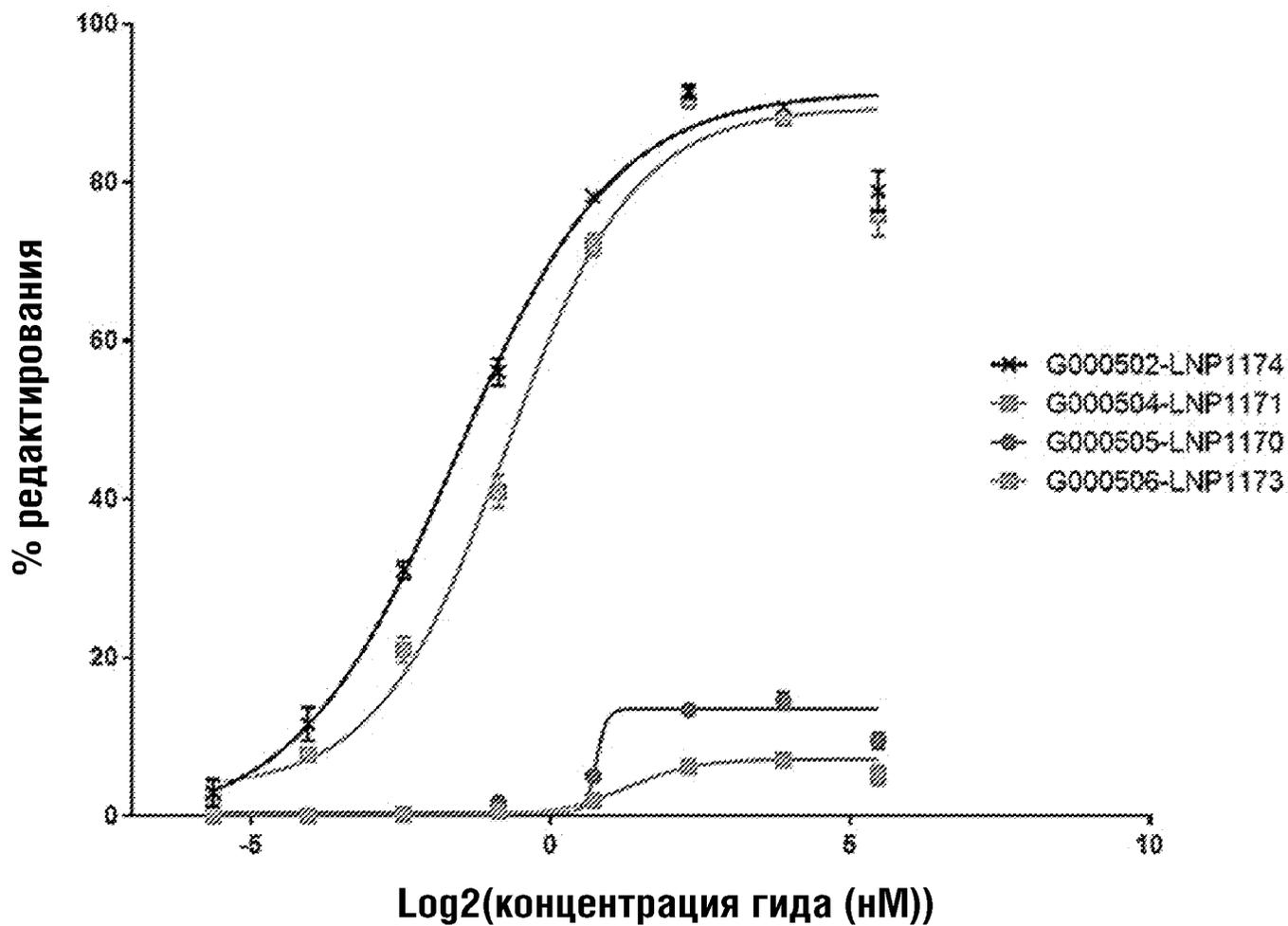
ФИГ.16

DRC сформированных LNP, включающих TTR с одноцепочечной РНК гидом (sgRNA) в первичных гепатоцитах обезьяны



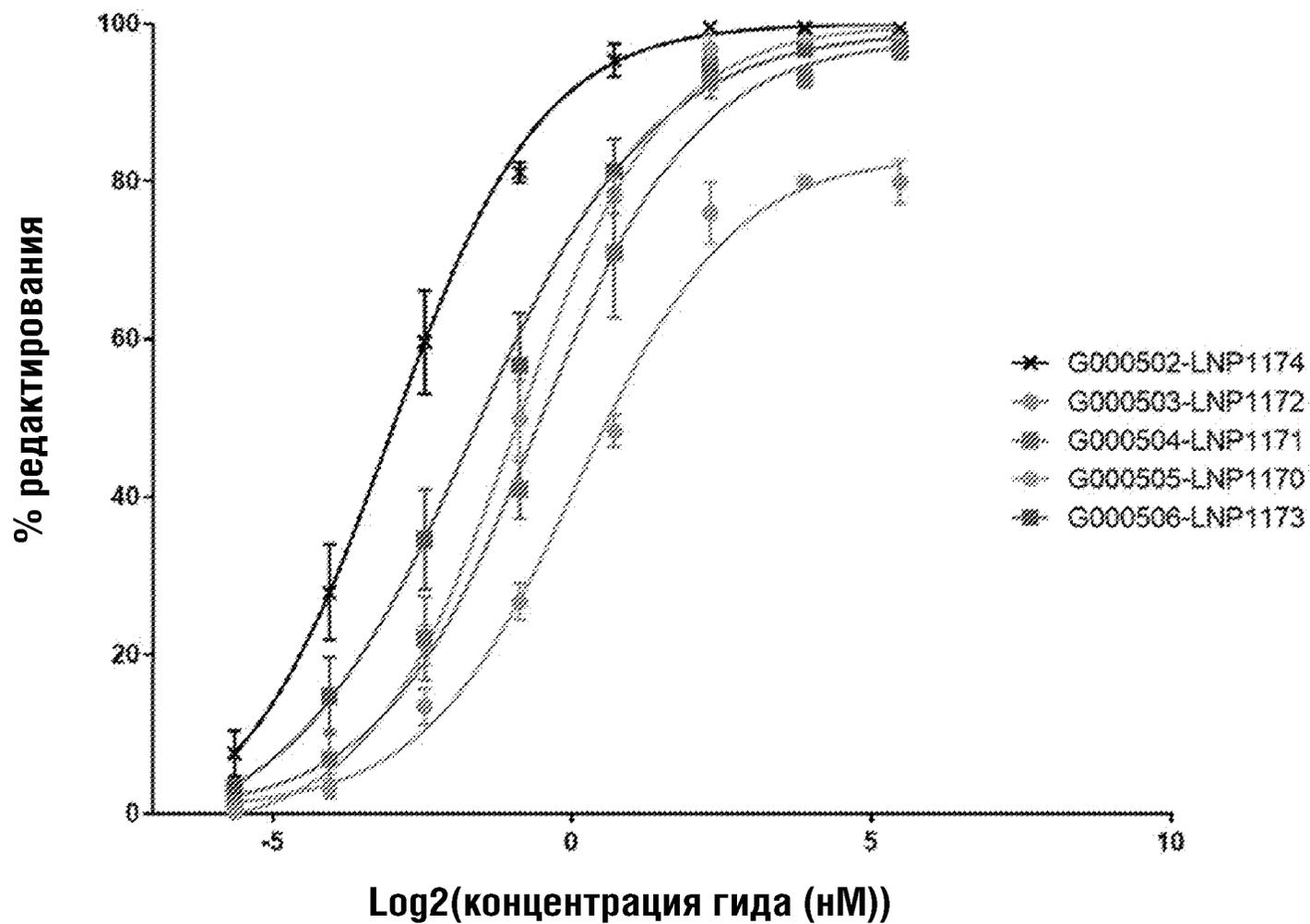
ФИГ.17

DRC сформированных LNP, включающих TTR, специфическую РНК гид (sgRNA) обезьяны в первичных гепатоцитах человека

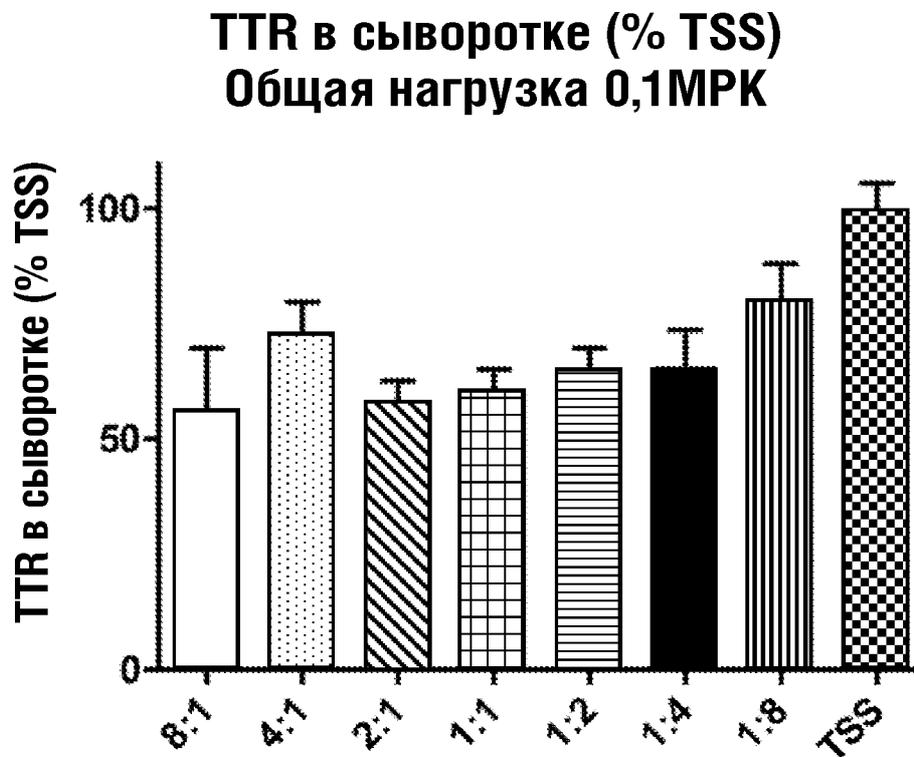


ФИГ.18

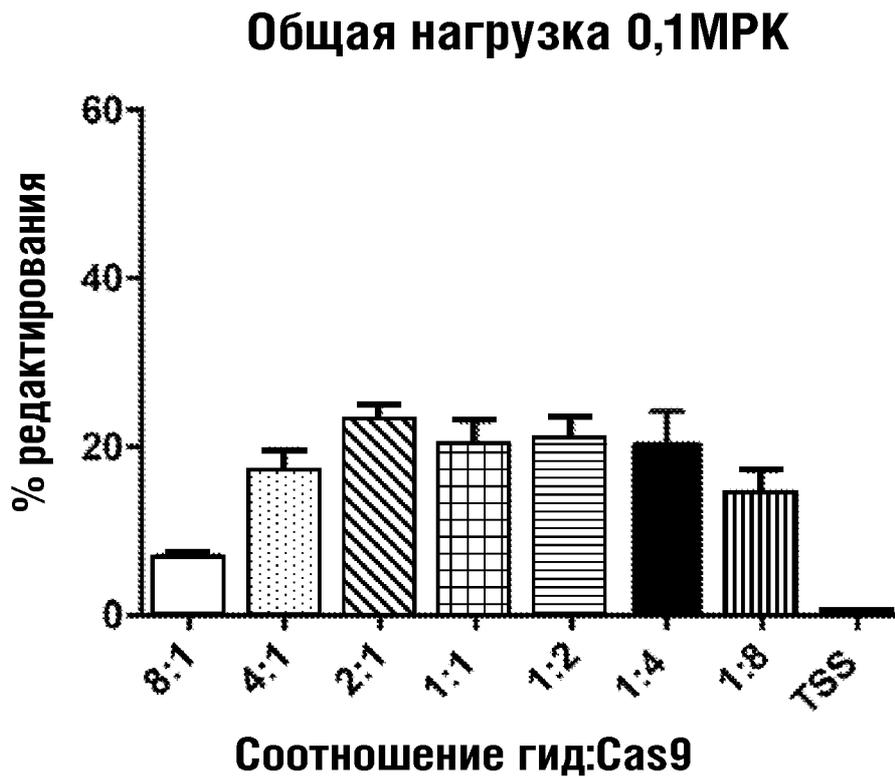
DRC сформированных LNP, включающих TTR, специфическую РНК гид (sgRNA) обезьяны в первичных гепатоцитах обезьяны



ФИГ.19А

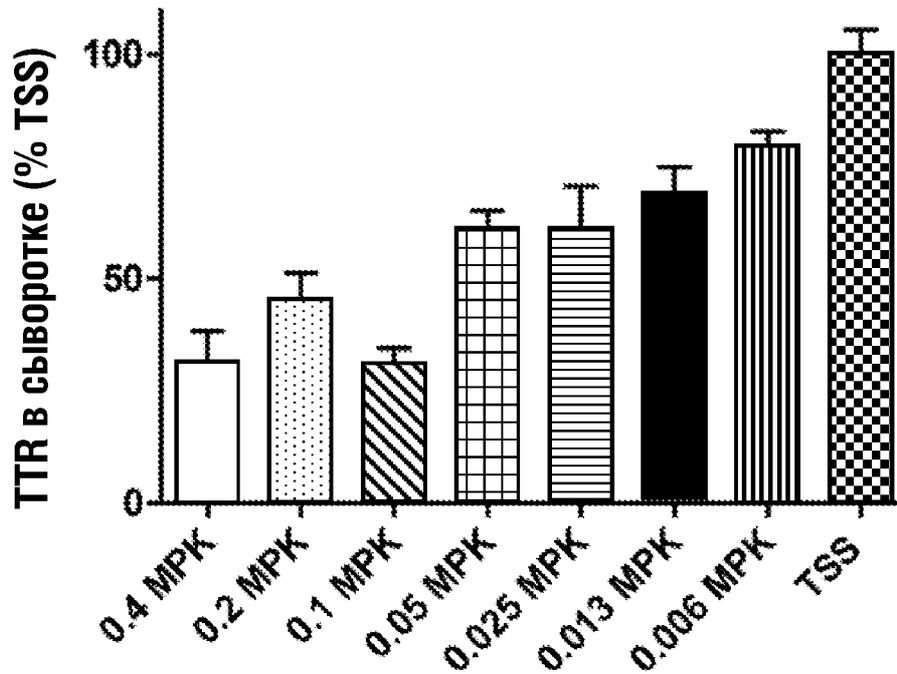


ФИГ.19В



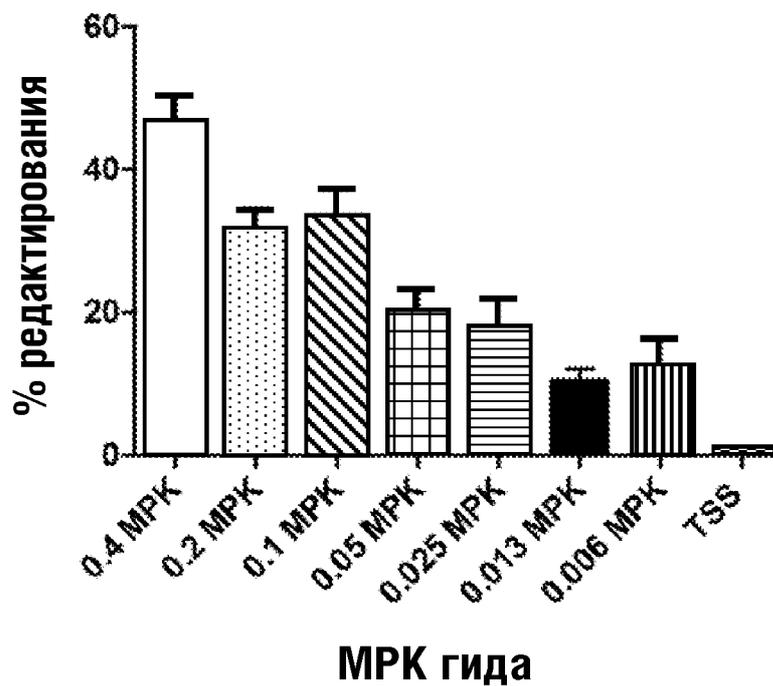
ФИГ.19С

TTR в сыворотке (% TSS)
Постоянная доза мРНК Cas9 0,5МРК

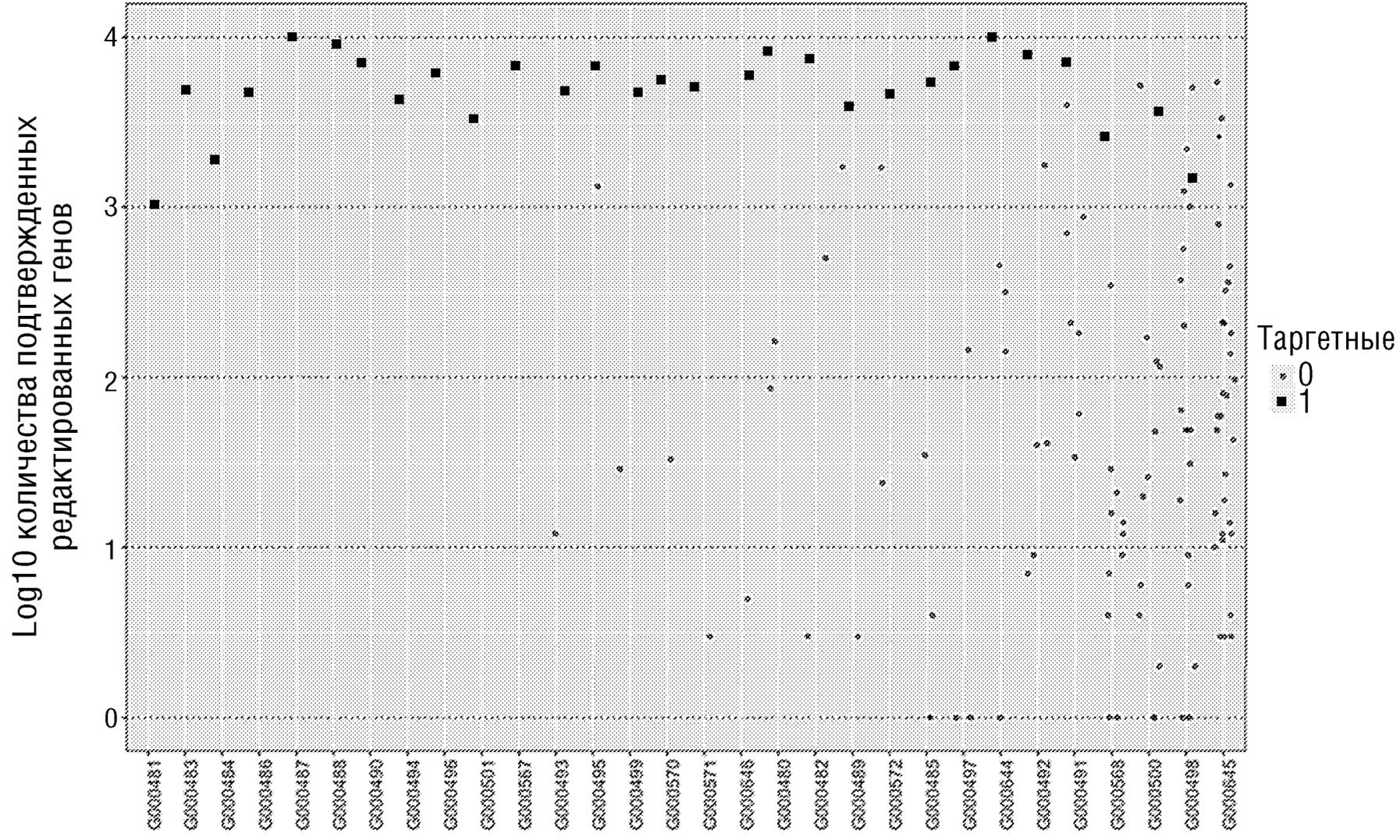


ФИГ.19D

Постоянная доза мРНК Cas9 0,5МРК

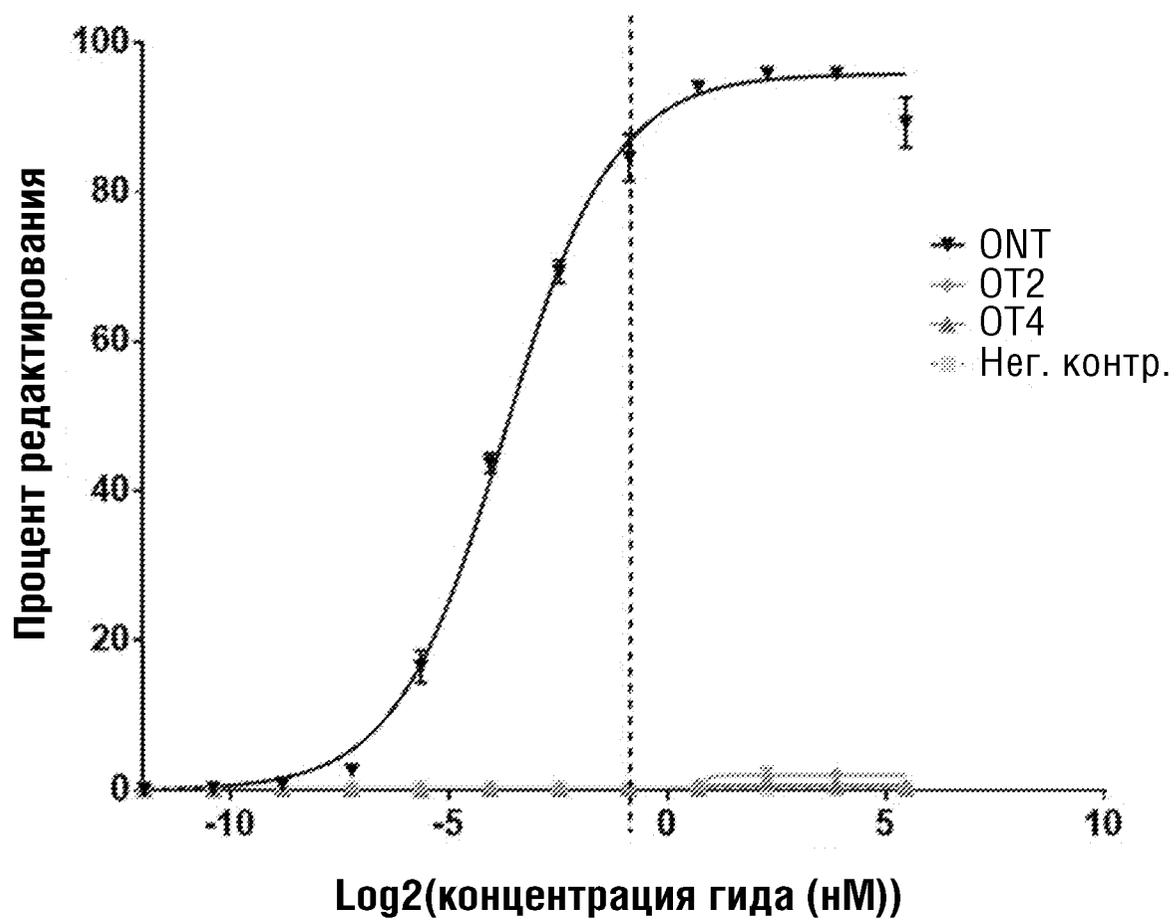


ФИГ.20



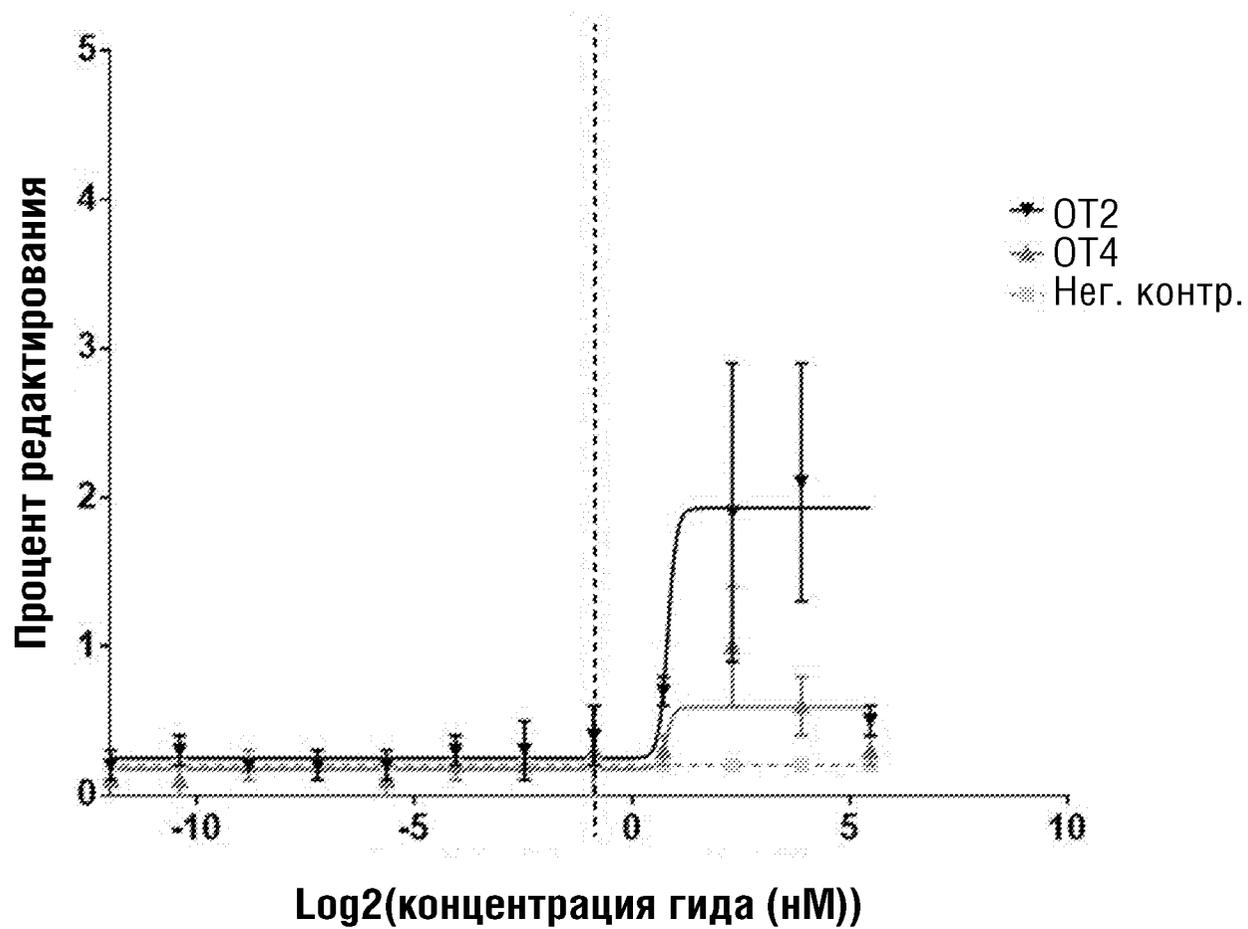
ФИГ.21А

DRC сформированных LNP G000480
в первичных гепатоцитах человека



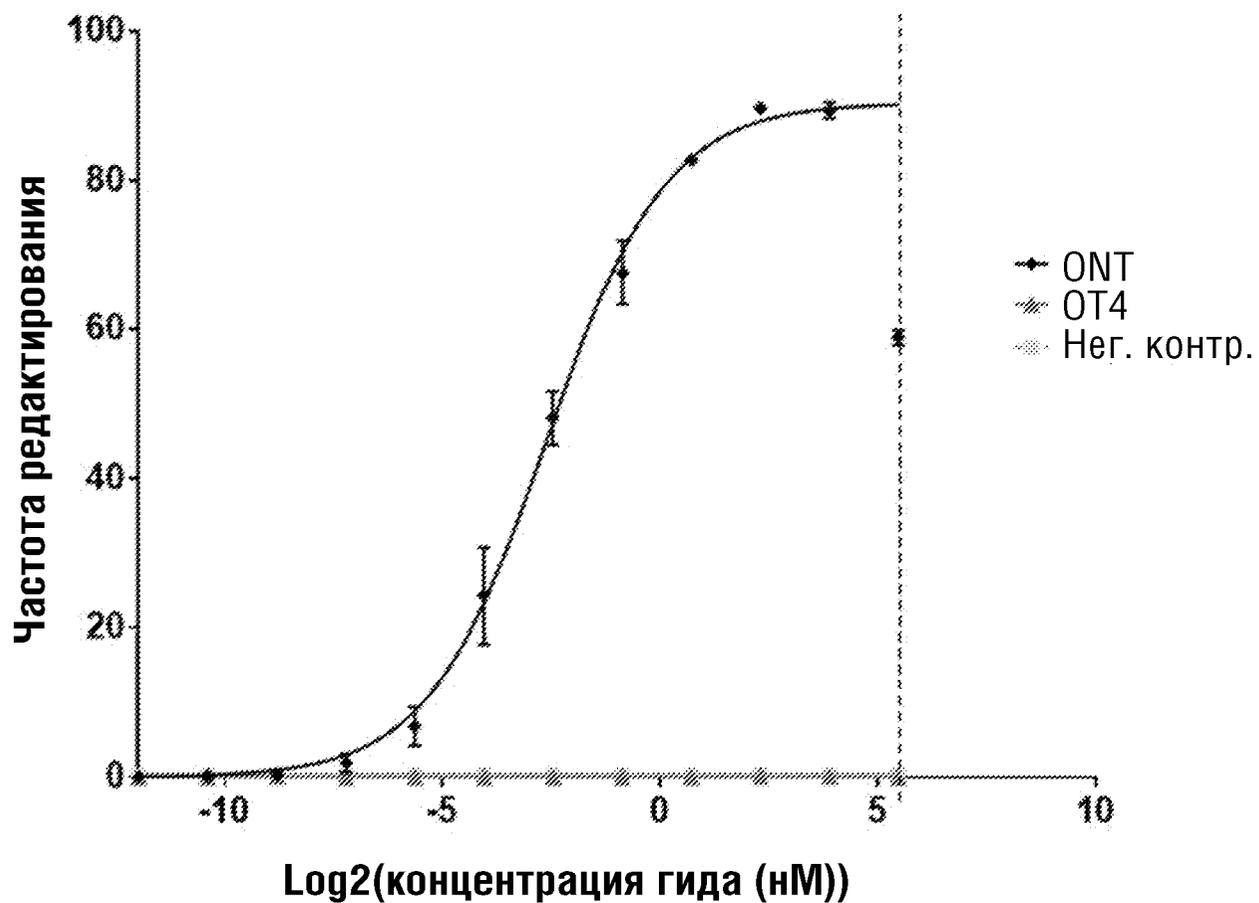
ФИГ.21В

DRC сформированных LNP G000480
в первичных гепатоцитах человека
(нетаргетные сайты)



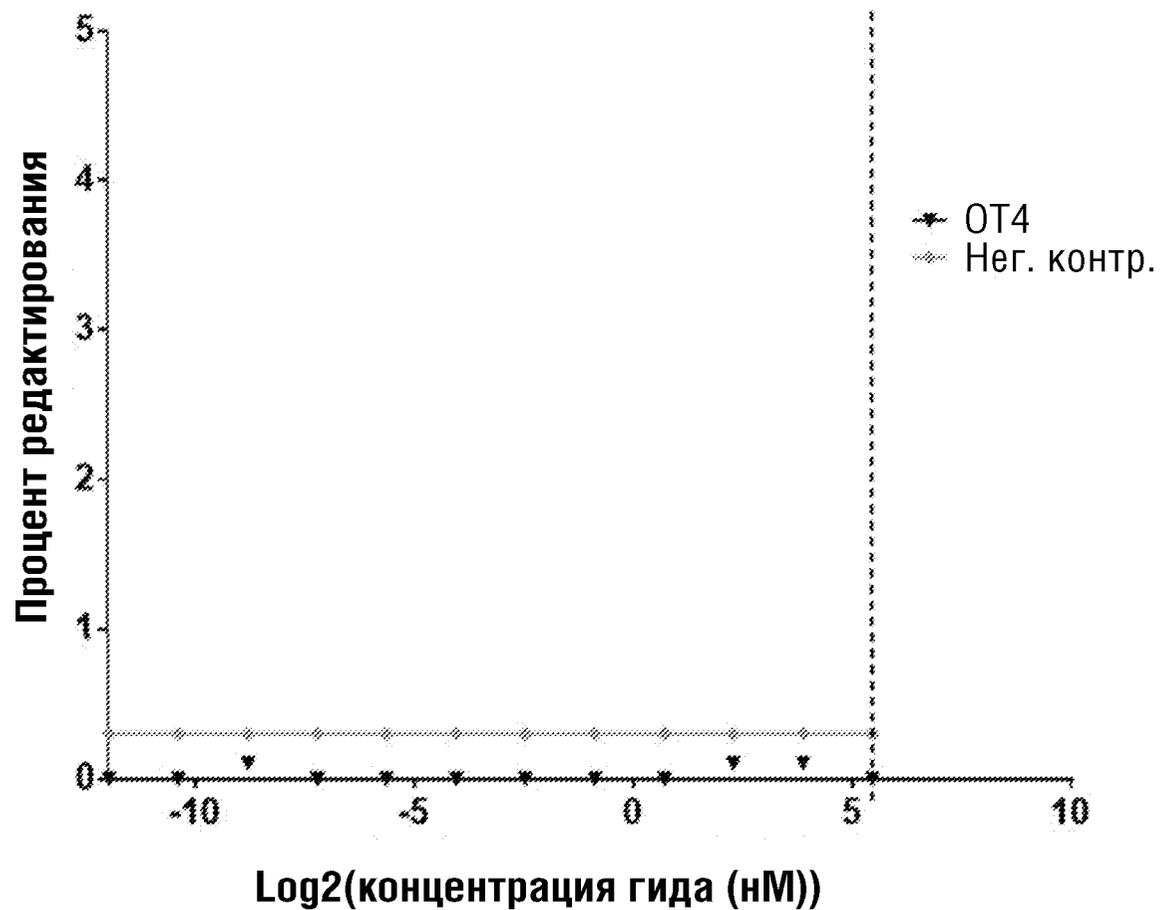
ФИГ.22А

DRC сформированных LNP G000486
в первичных гепатоцитах человека



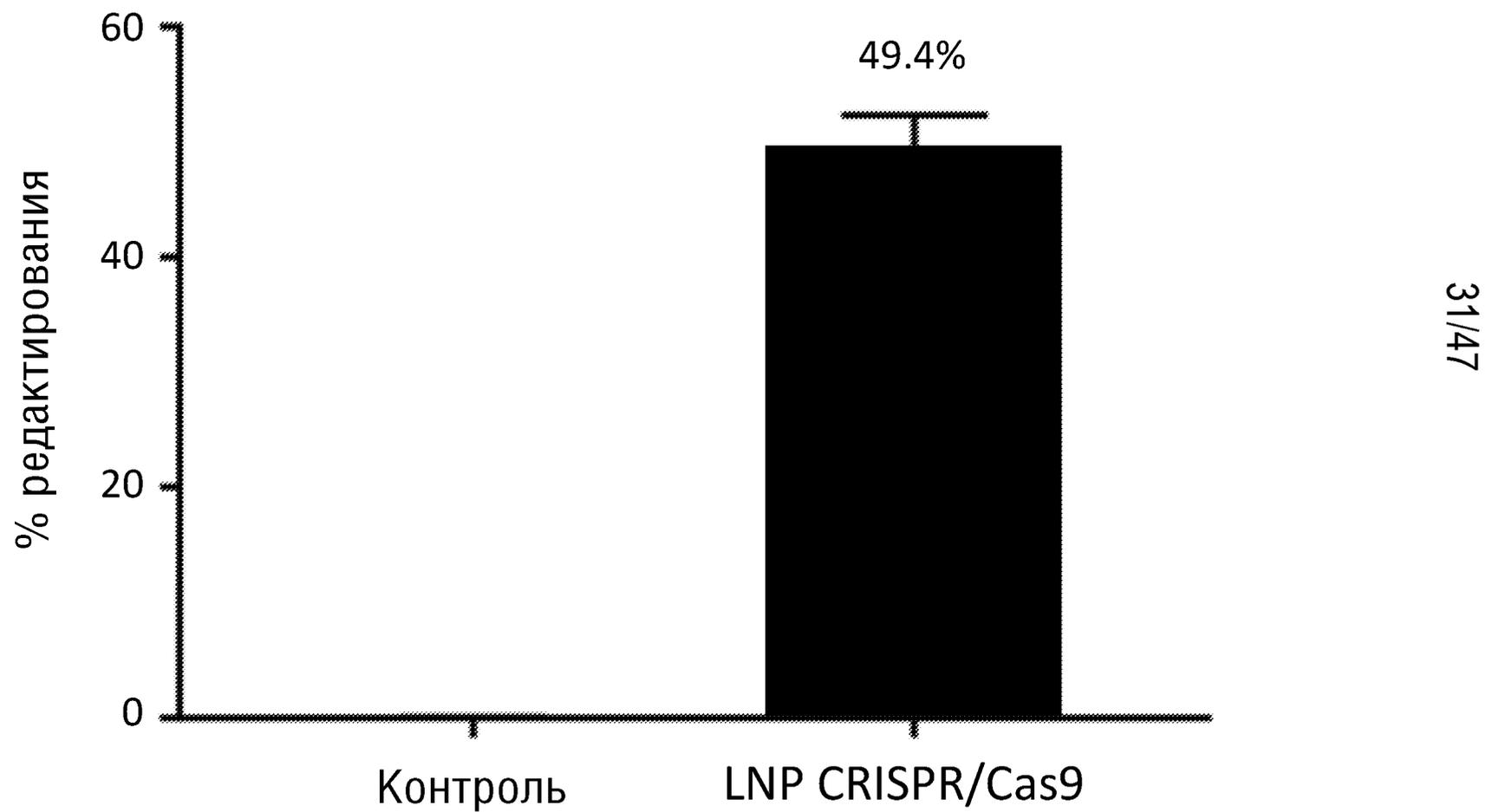
ФИГ.22В

DRC сформированных LNP G000486
в первичных гепатоцитах человека
(нетаргетные сайты)



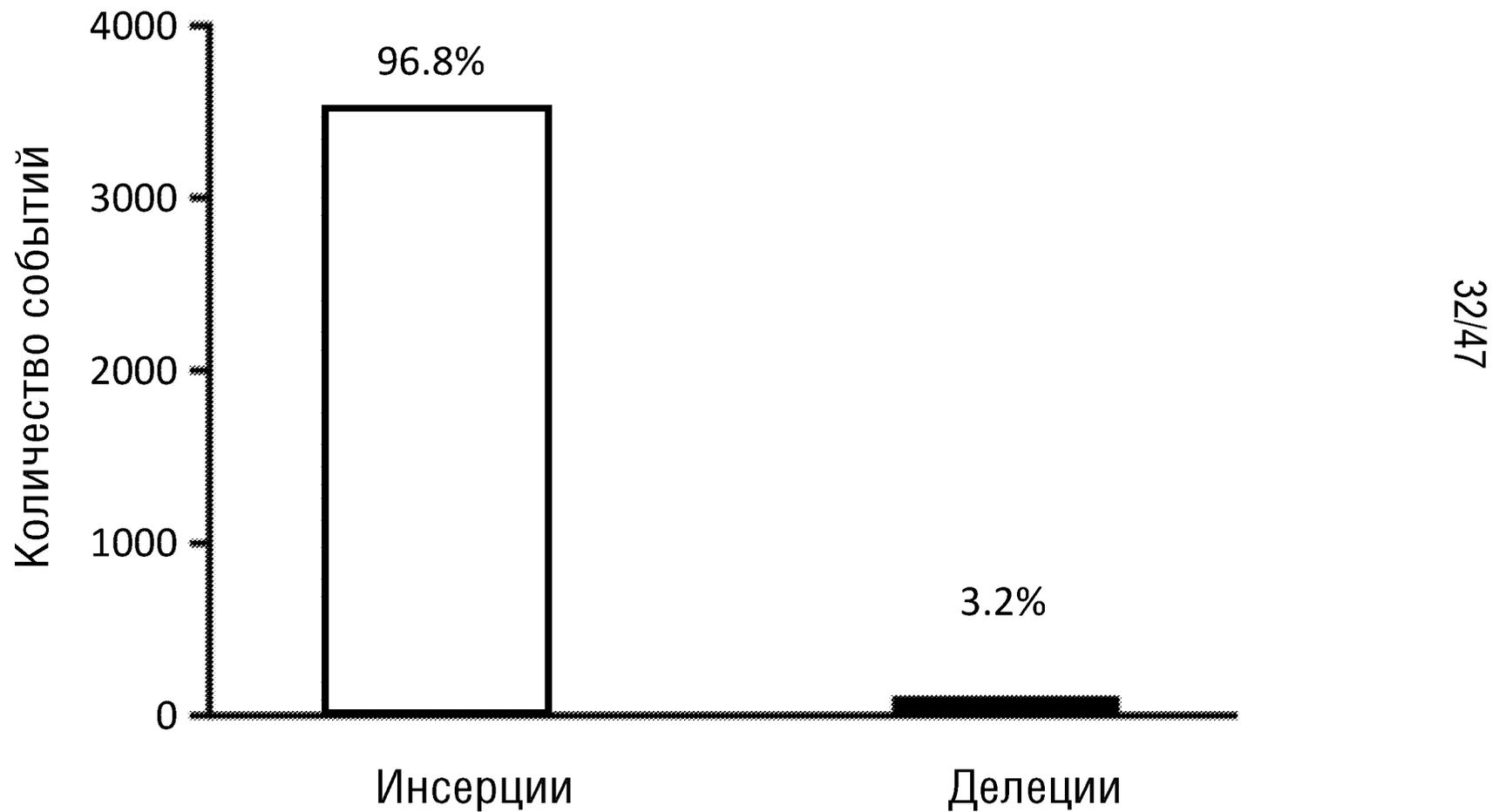
ФИГ.23А

Редактирование локуса TTR

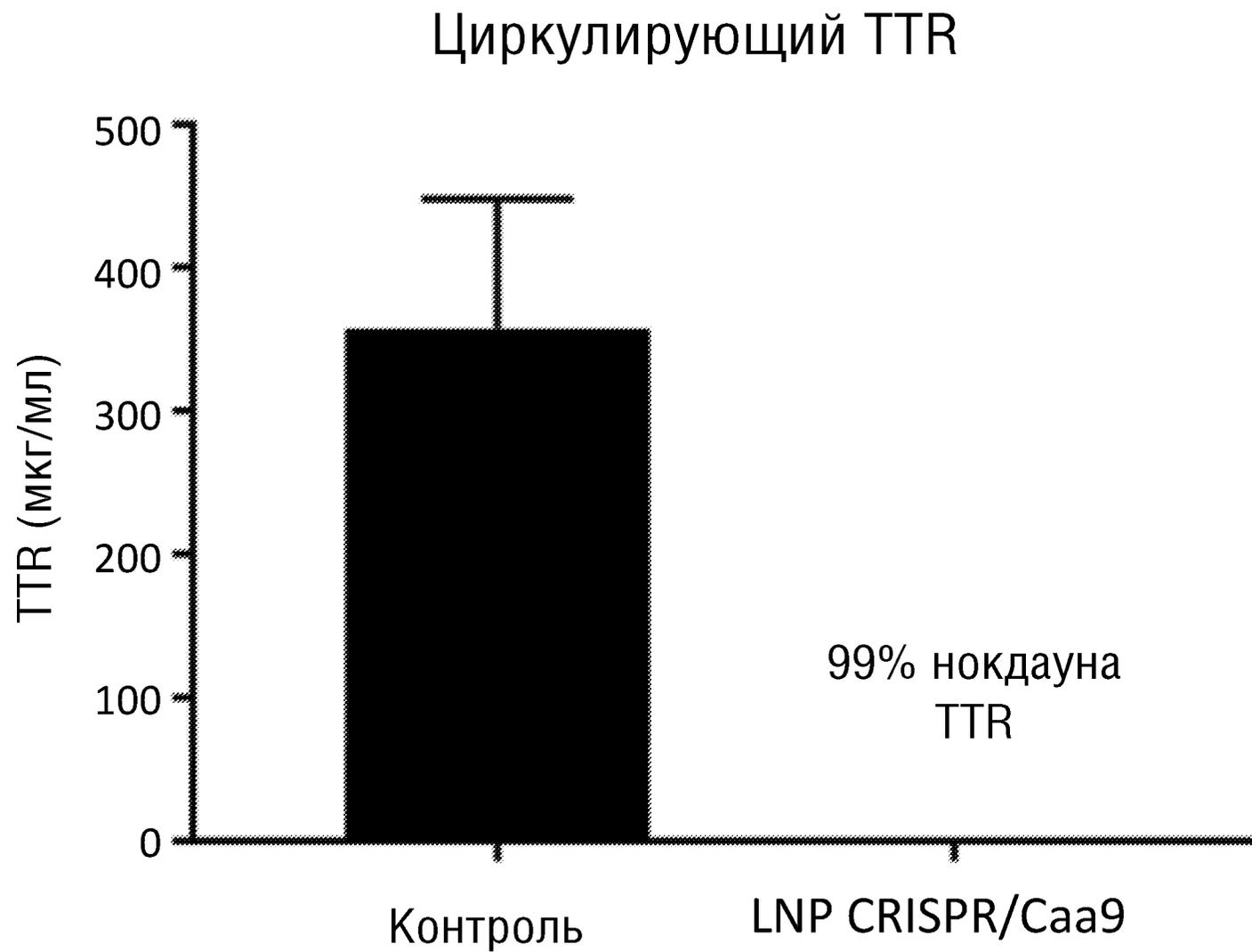


ФИГ.23В

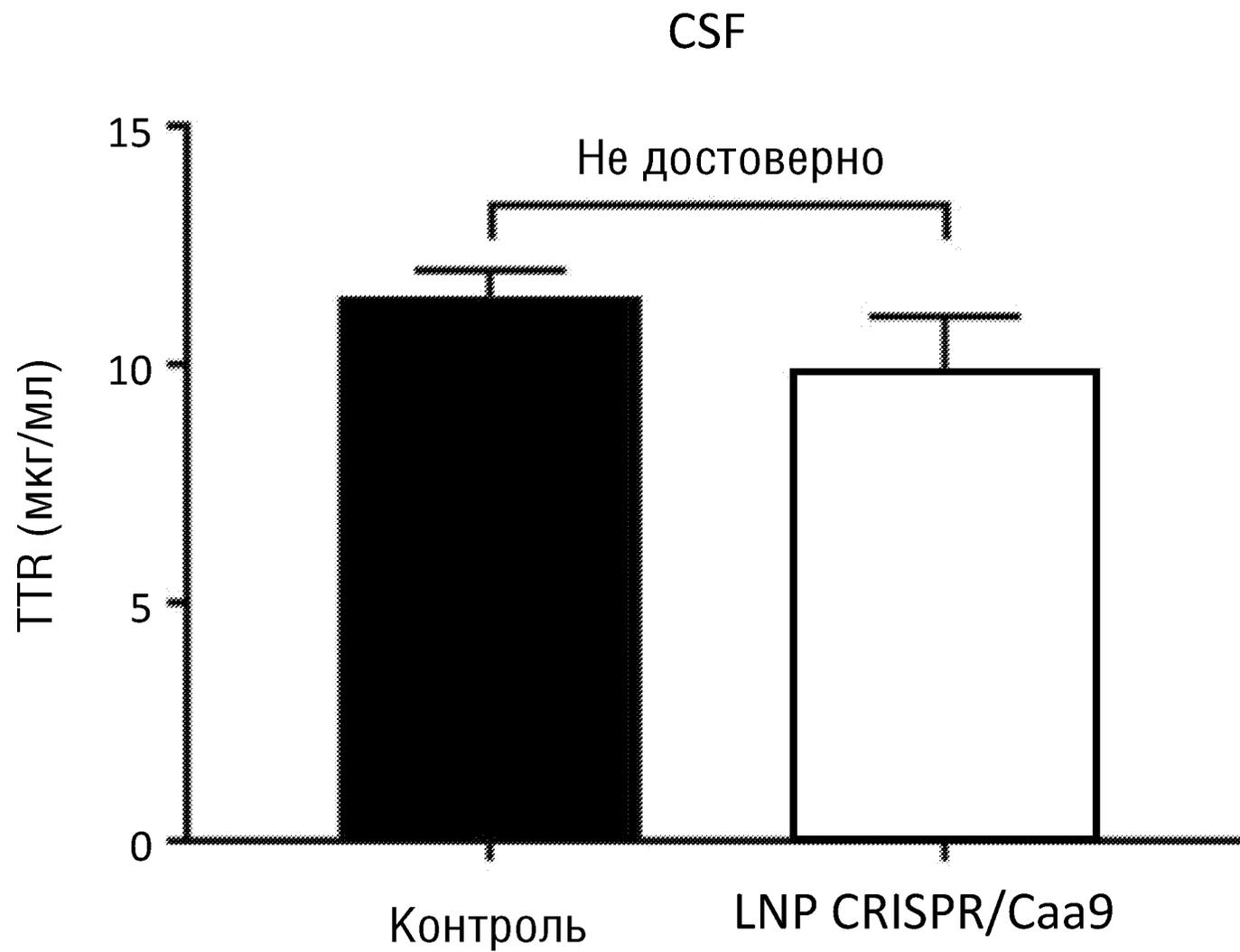
Резюме результатов секвенирования
следующего поколения (NGS)



ФИГ.24А



ФИГ.24В

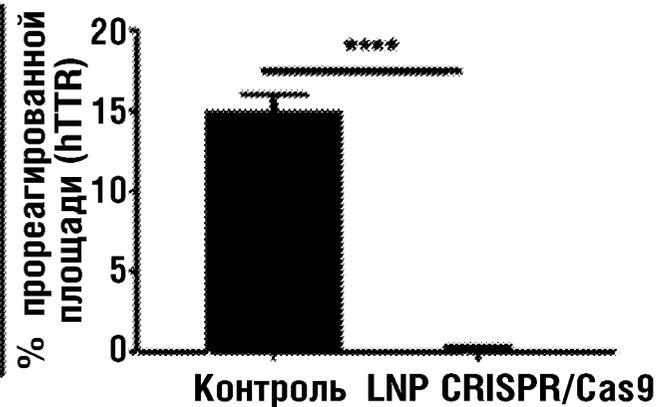
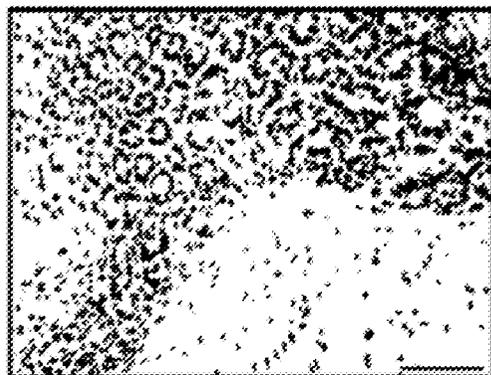


ФИГ.25А

Контроль

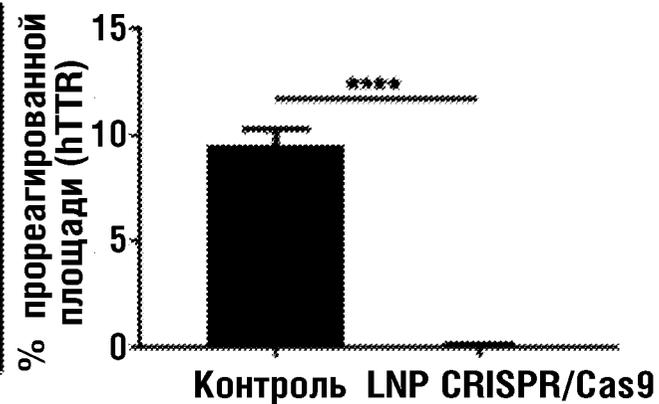
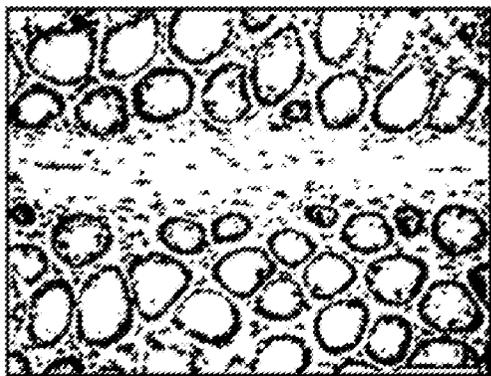
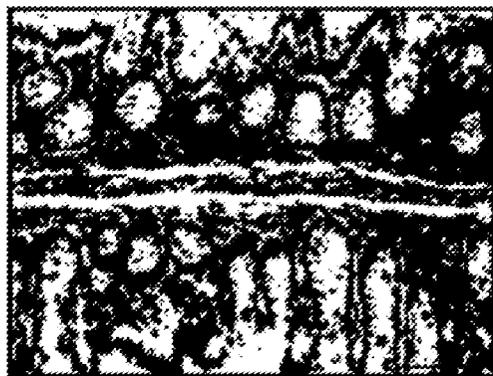
LNP CRISPR/Cas9

Желудок



ФИГ.25В

Кишечник

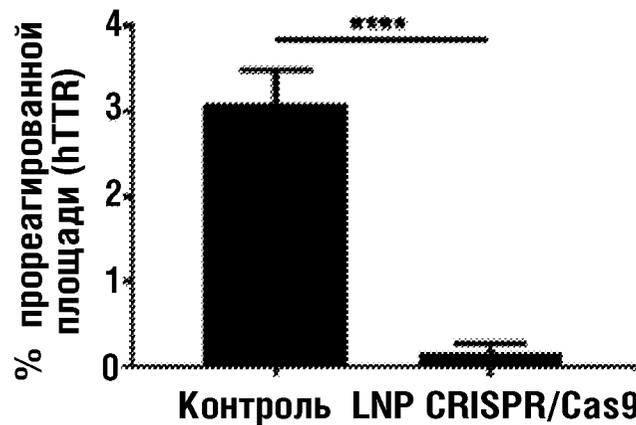
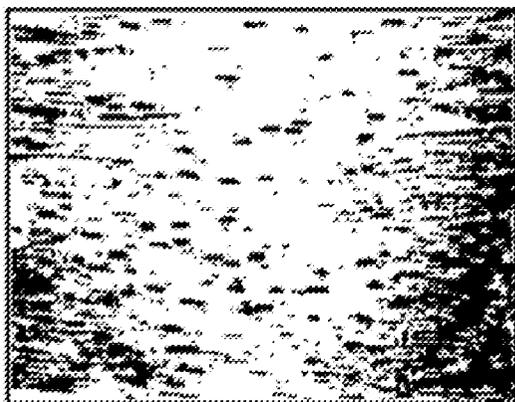
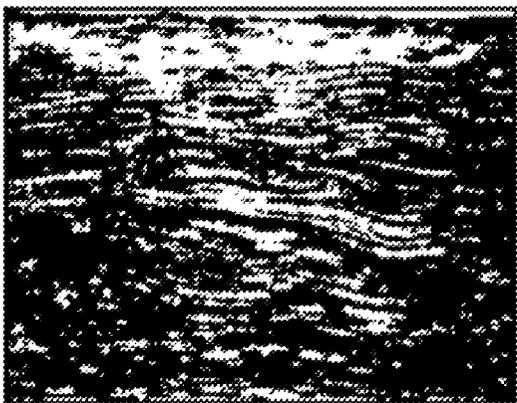


ФИГ.25С

Контроль

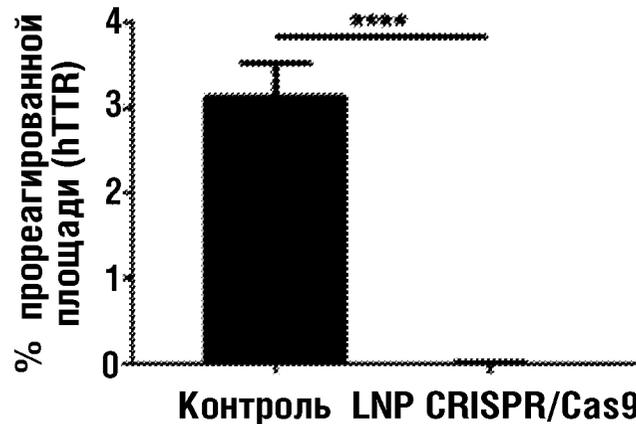
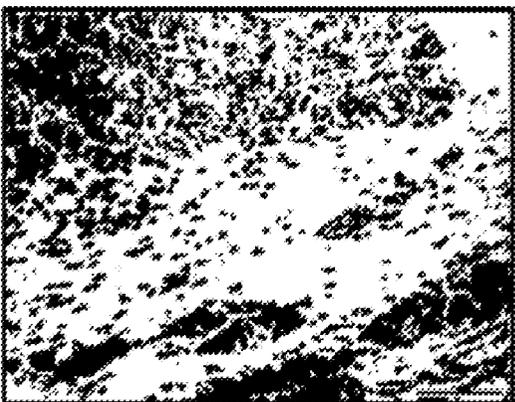
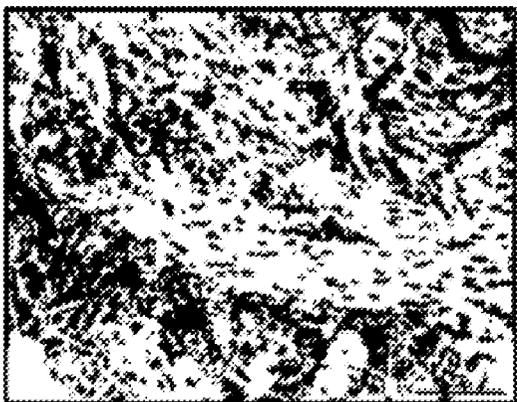
LNP CRISPR/Cas9

**Седалищный
нерв**



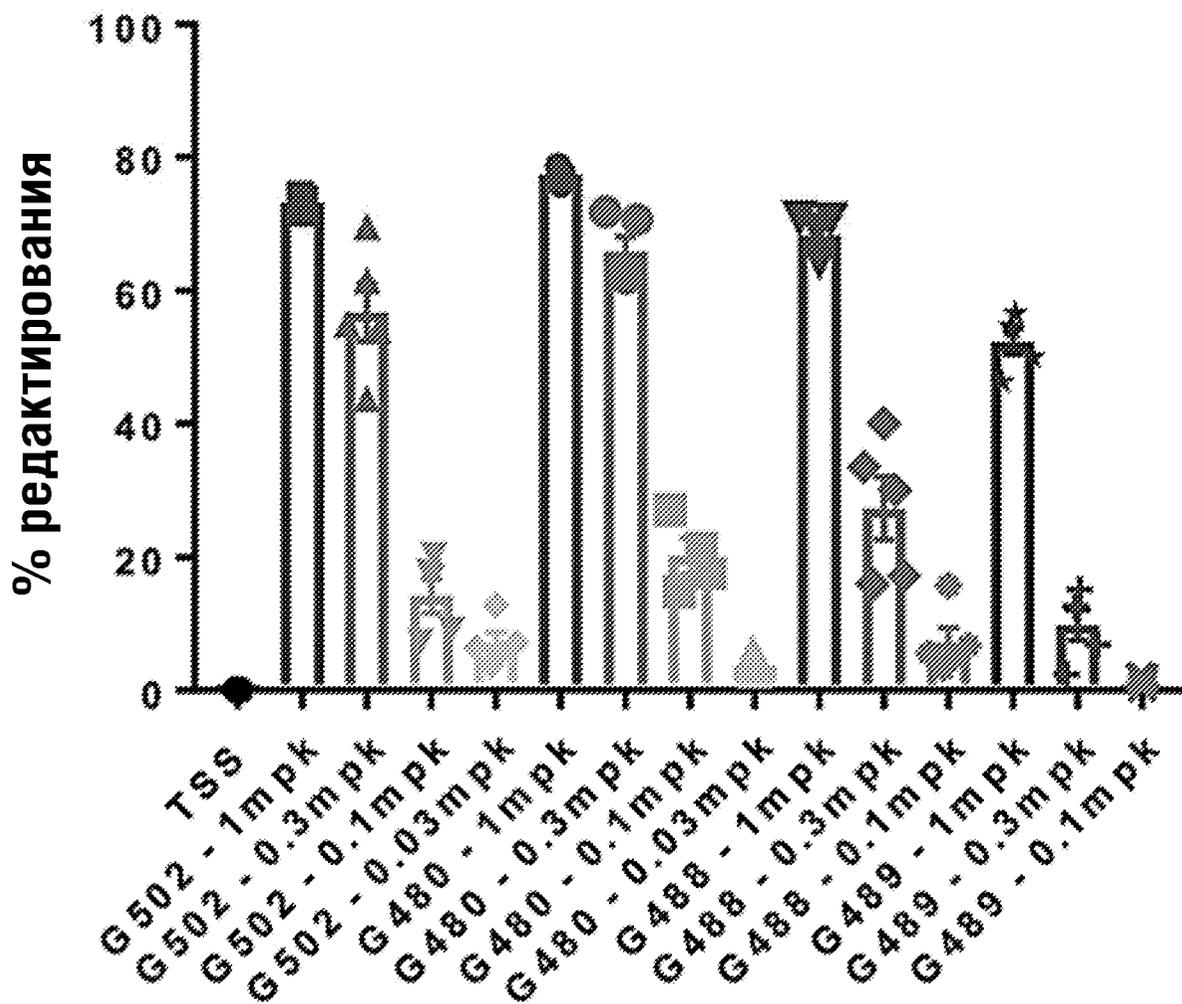
ФИГ.25D

**Ганглии
дорсальных
корешков**

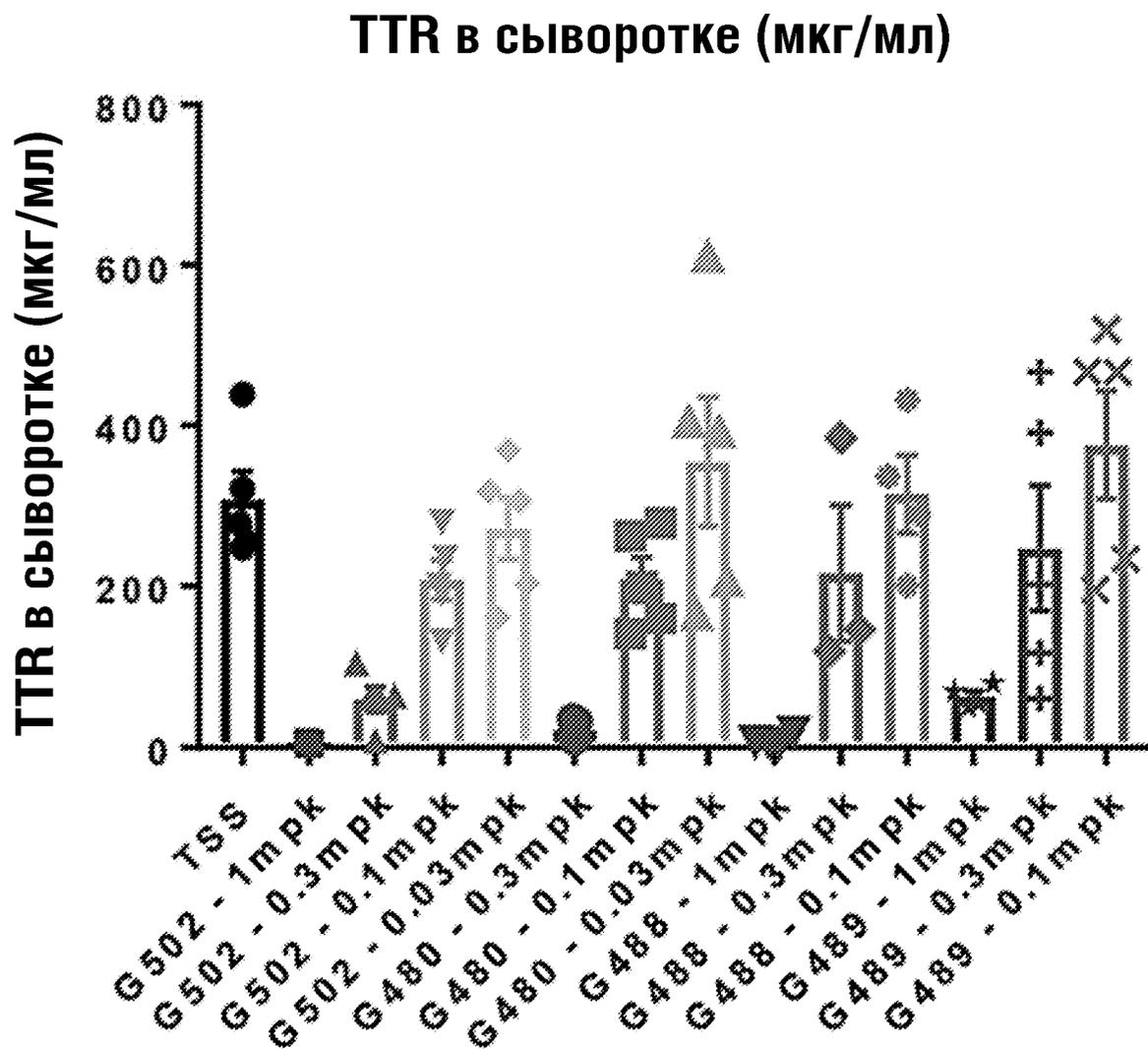


ФИГ.26А

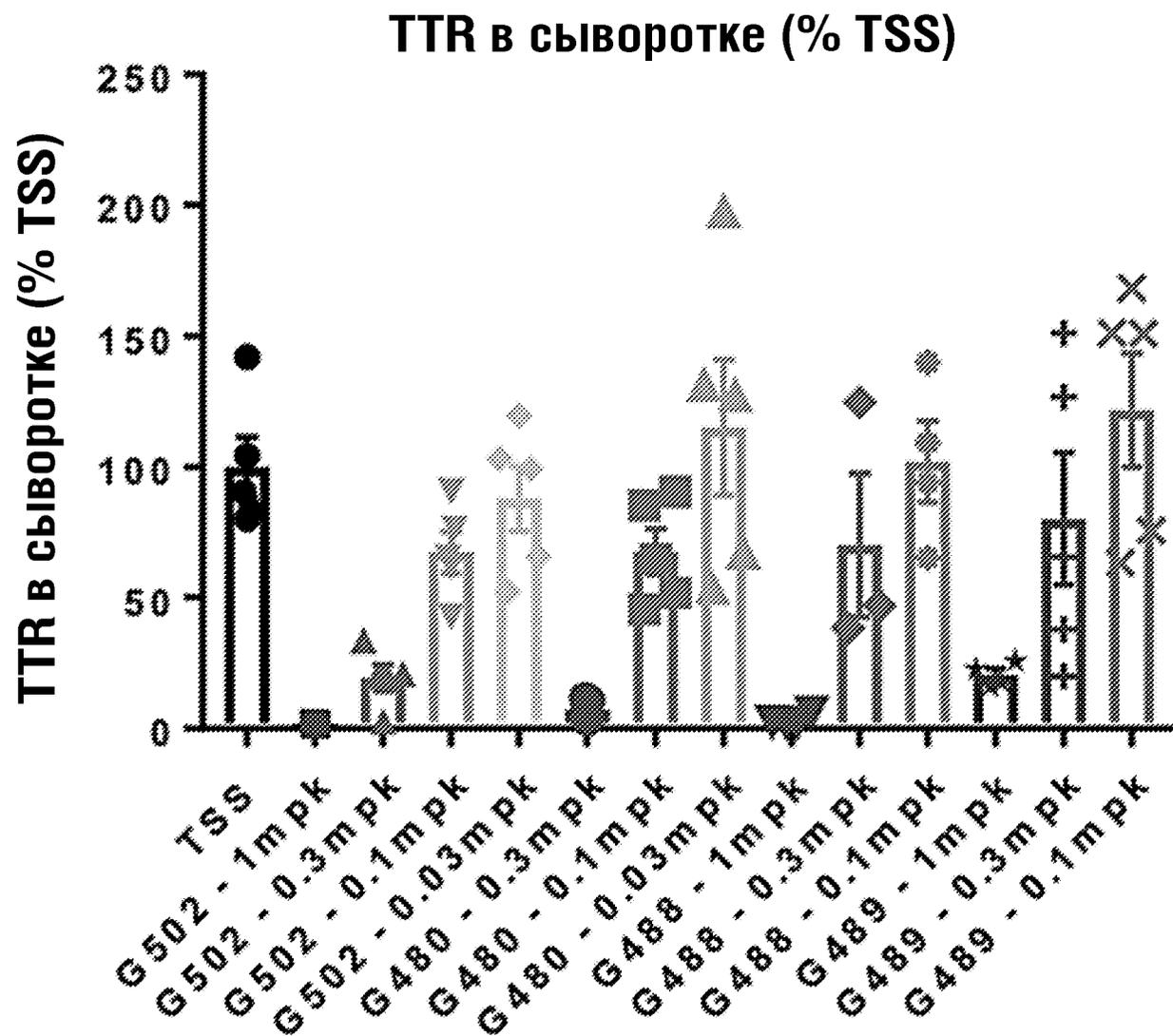
Редактирование в печени



ФИГ.26В

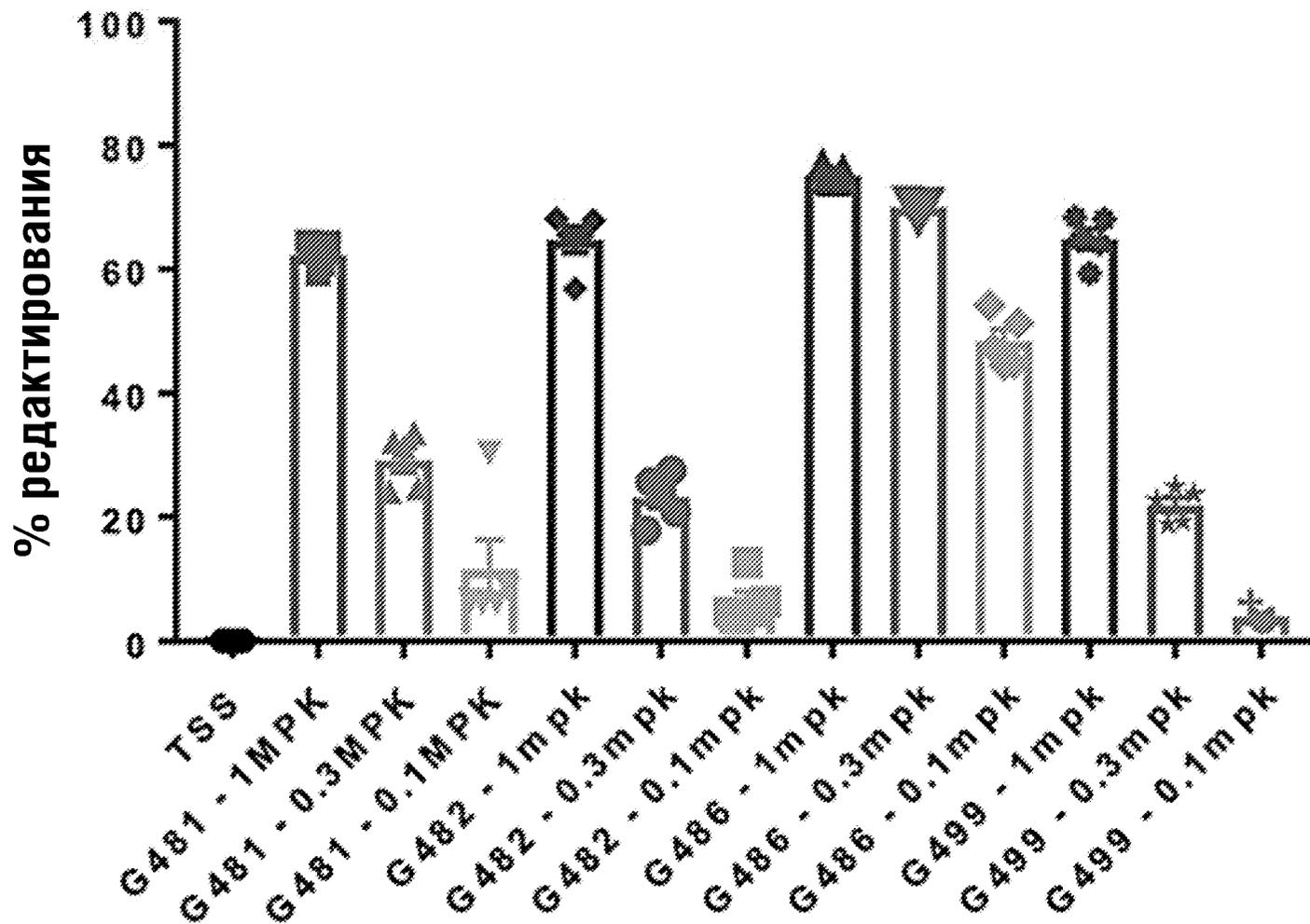


ФИГ.26С

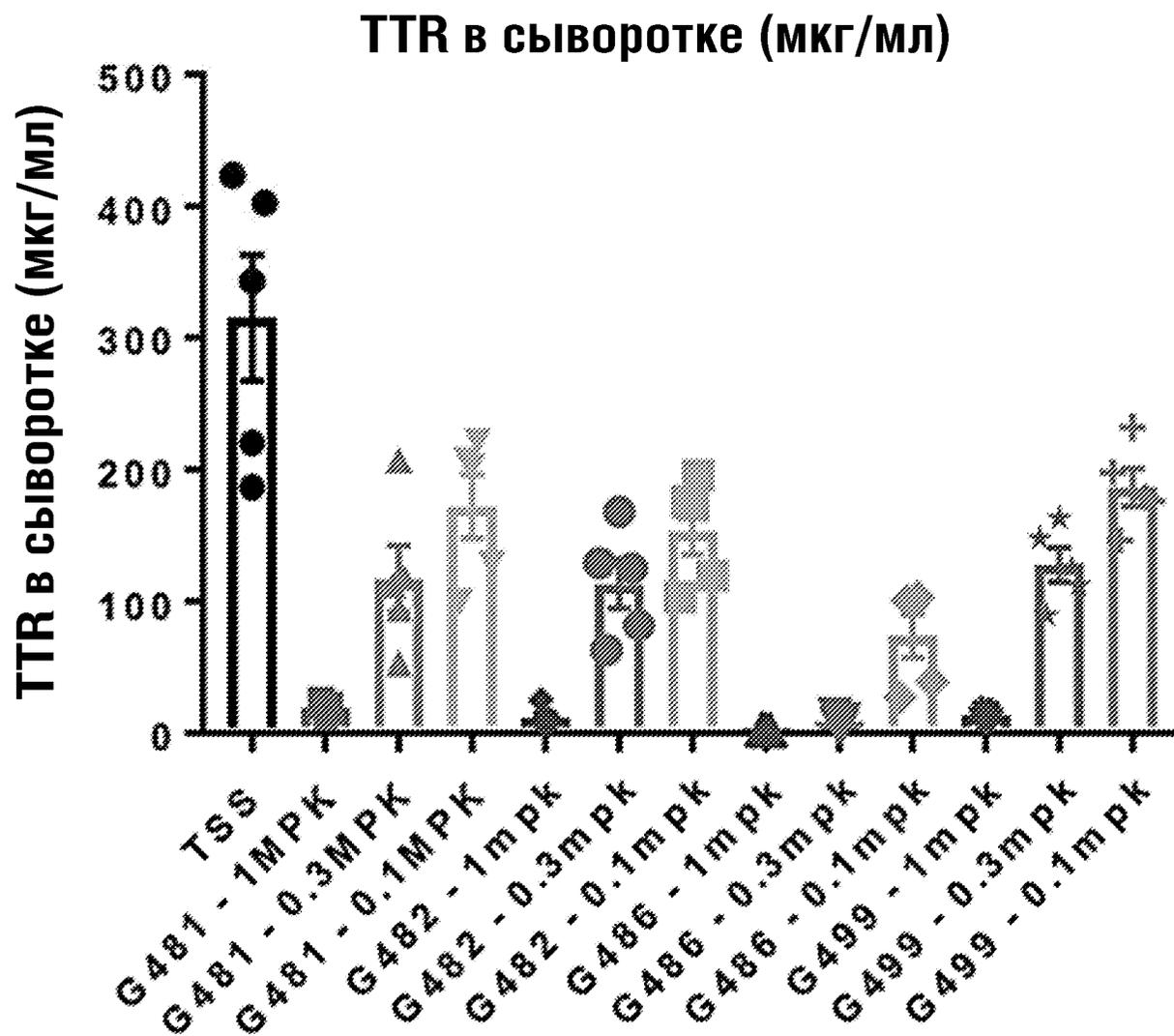


ФИГ.27А

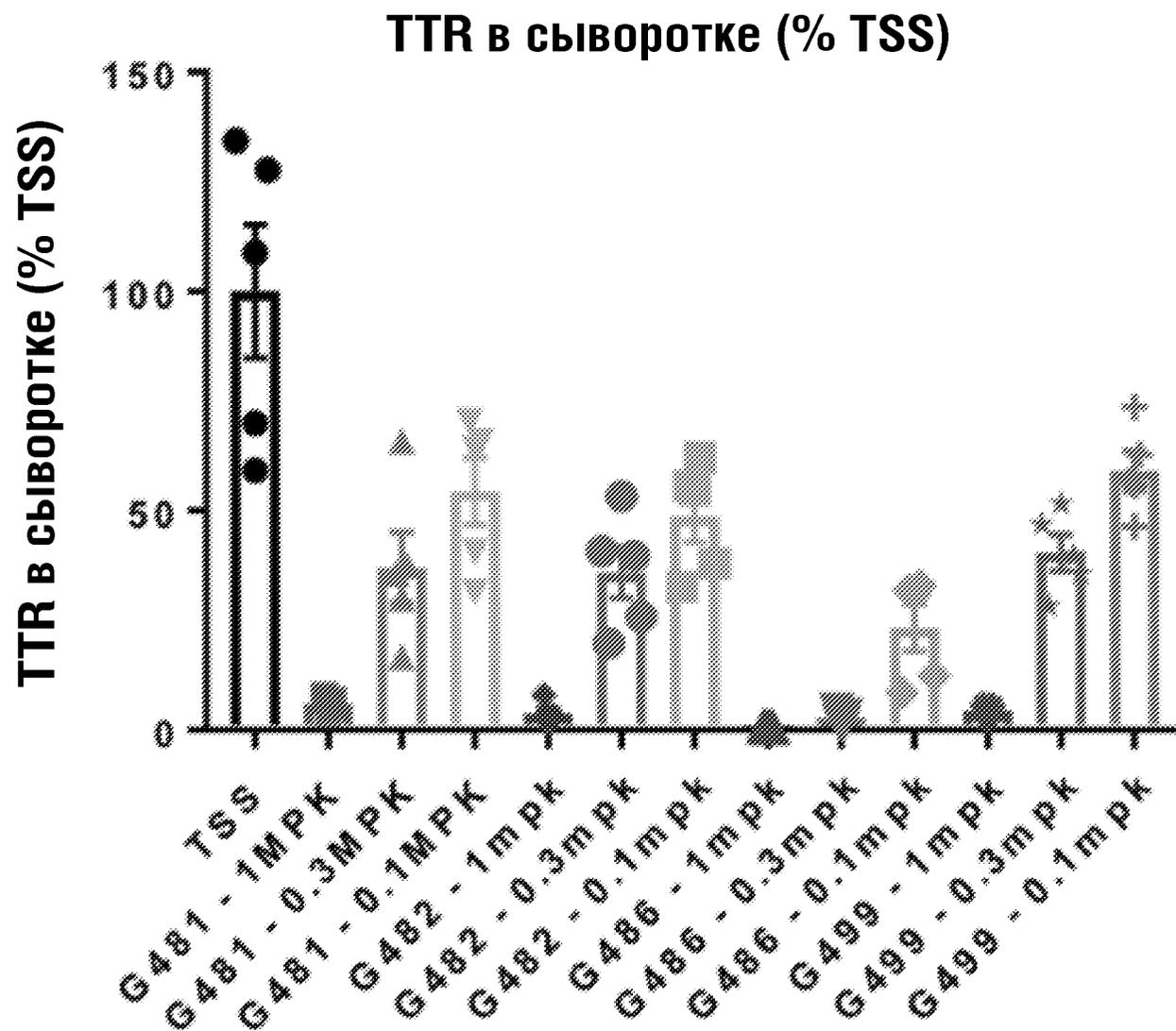
Редактирование в печени



ФИГ.27В

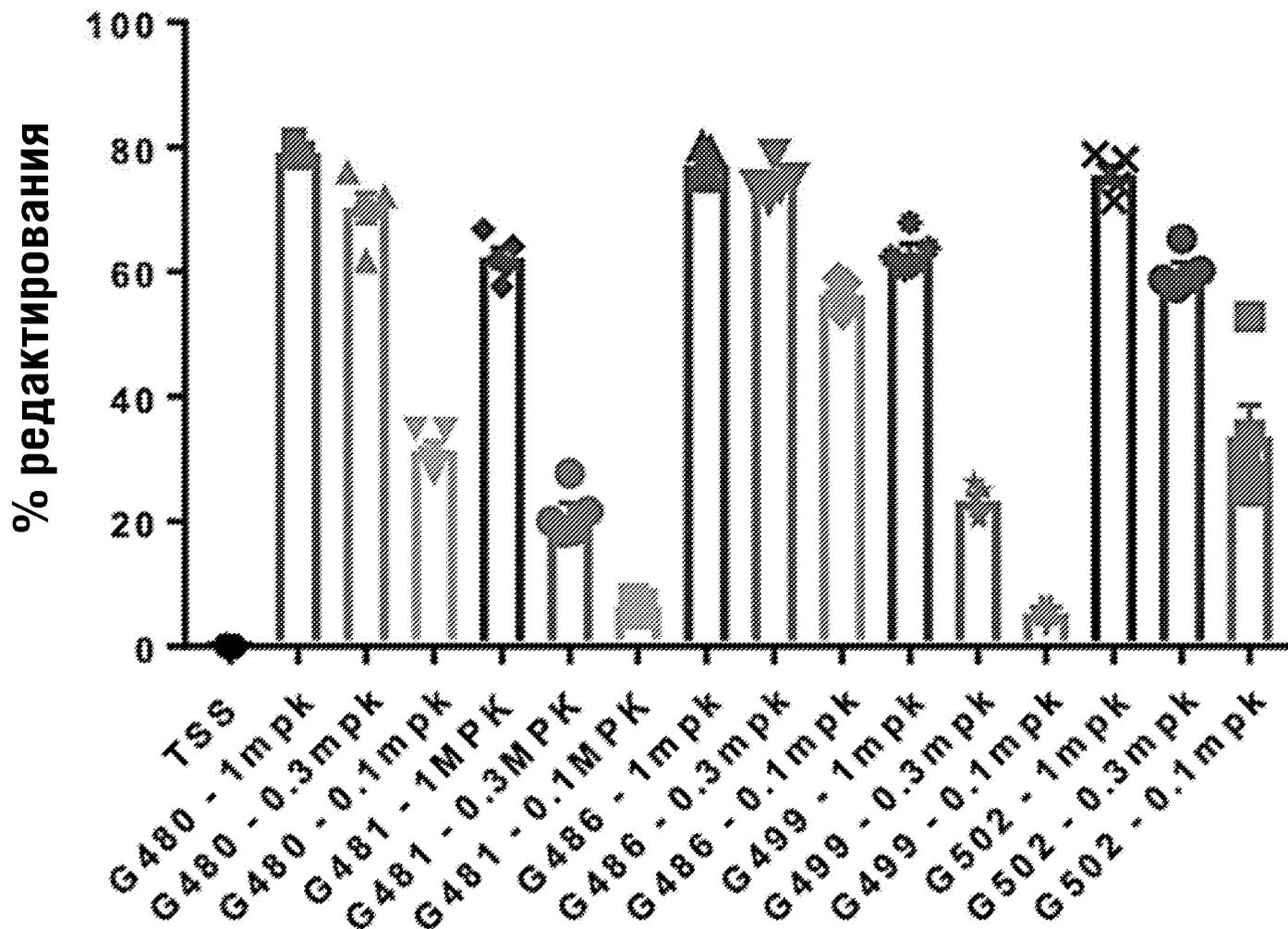


ФИГ.27С

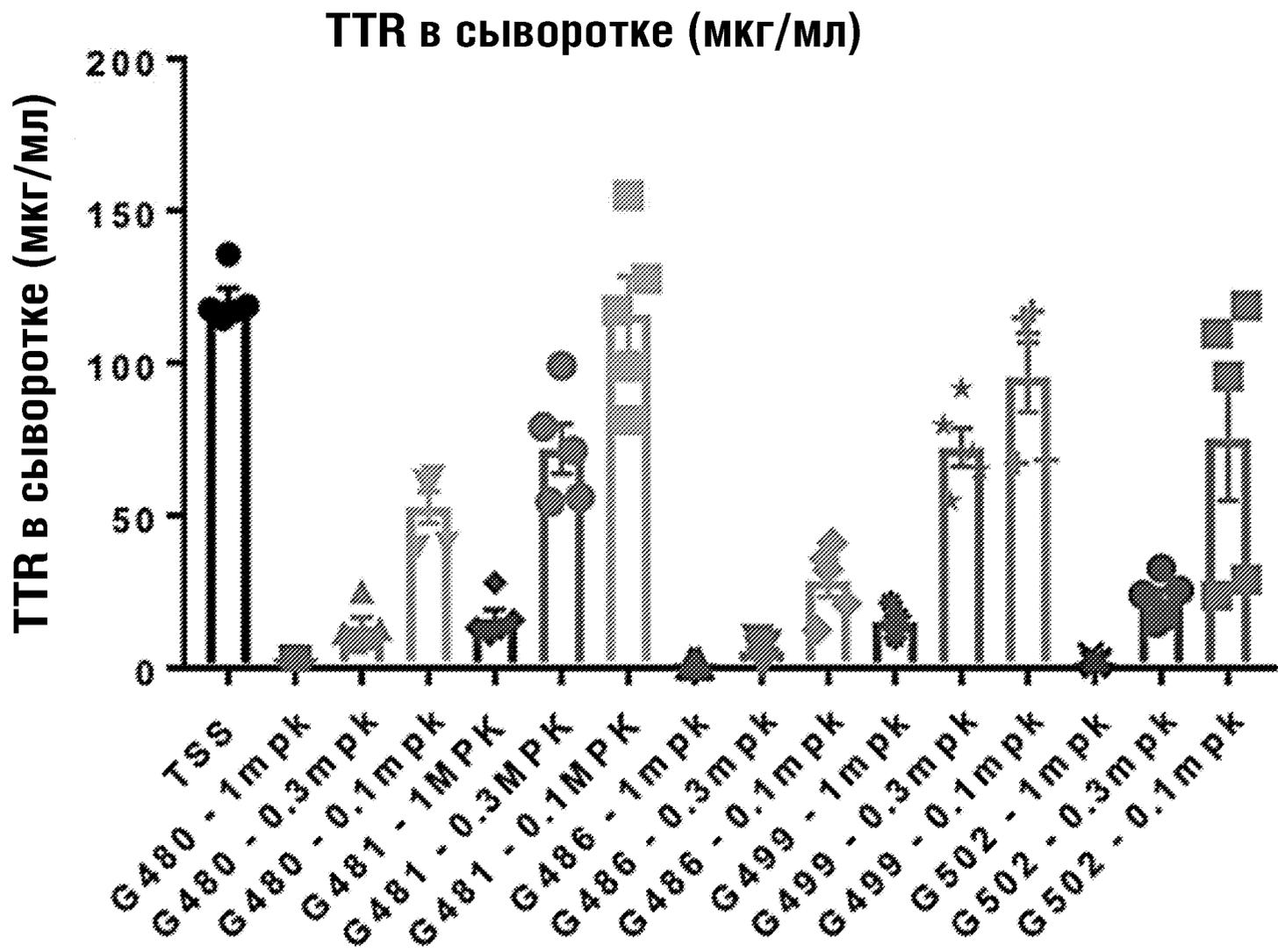


ФИГ.28А

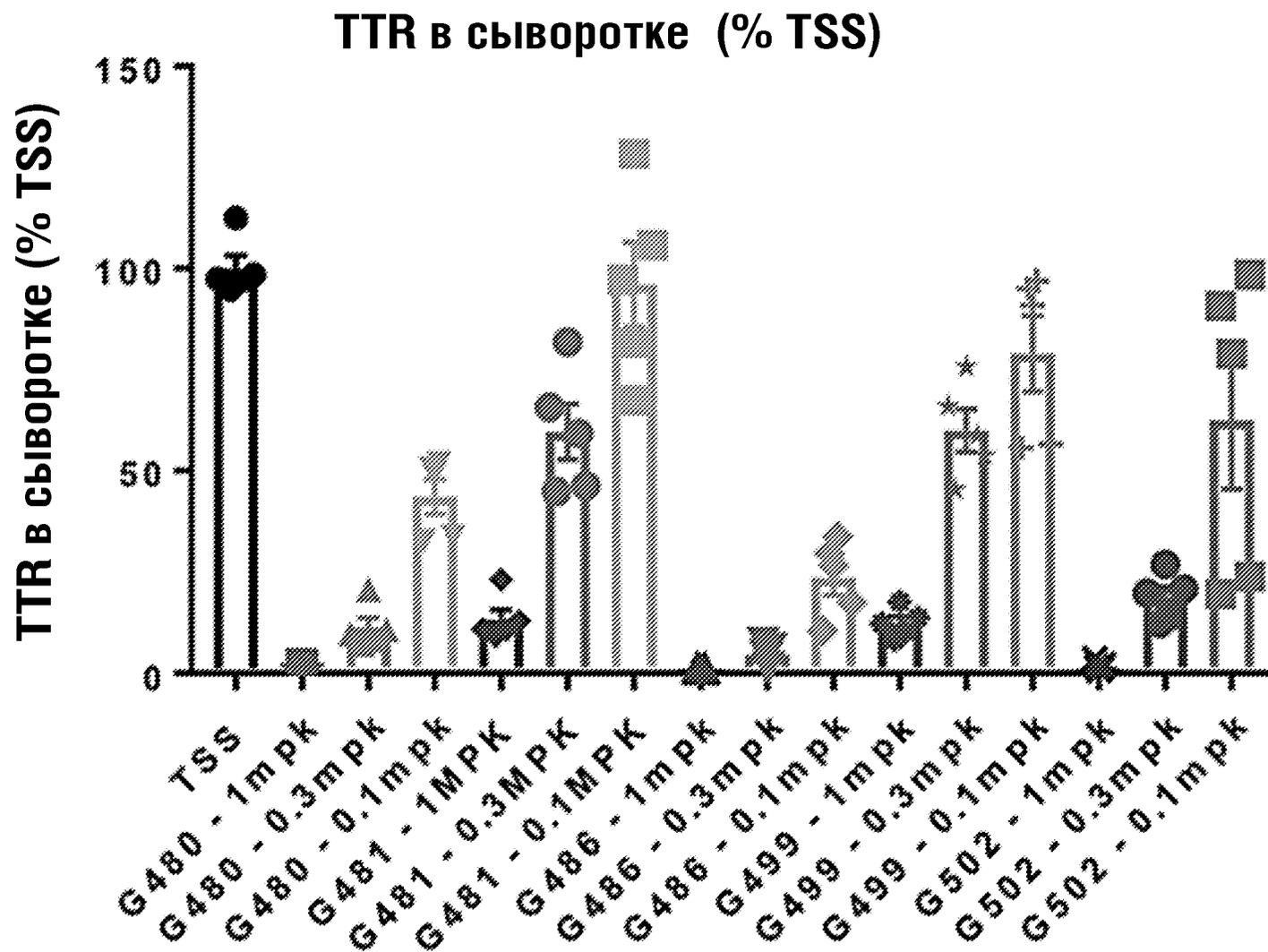
Редактирование в печени



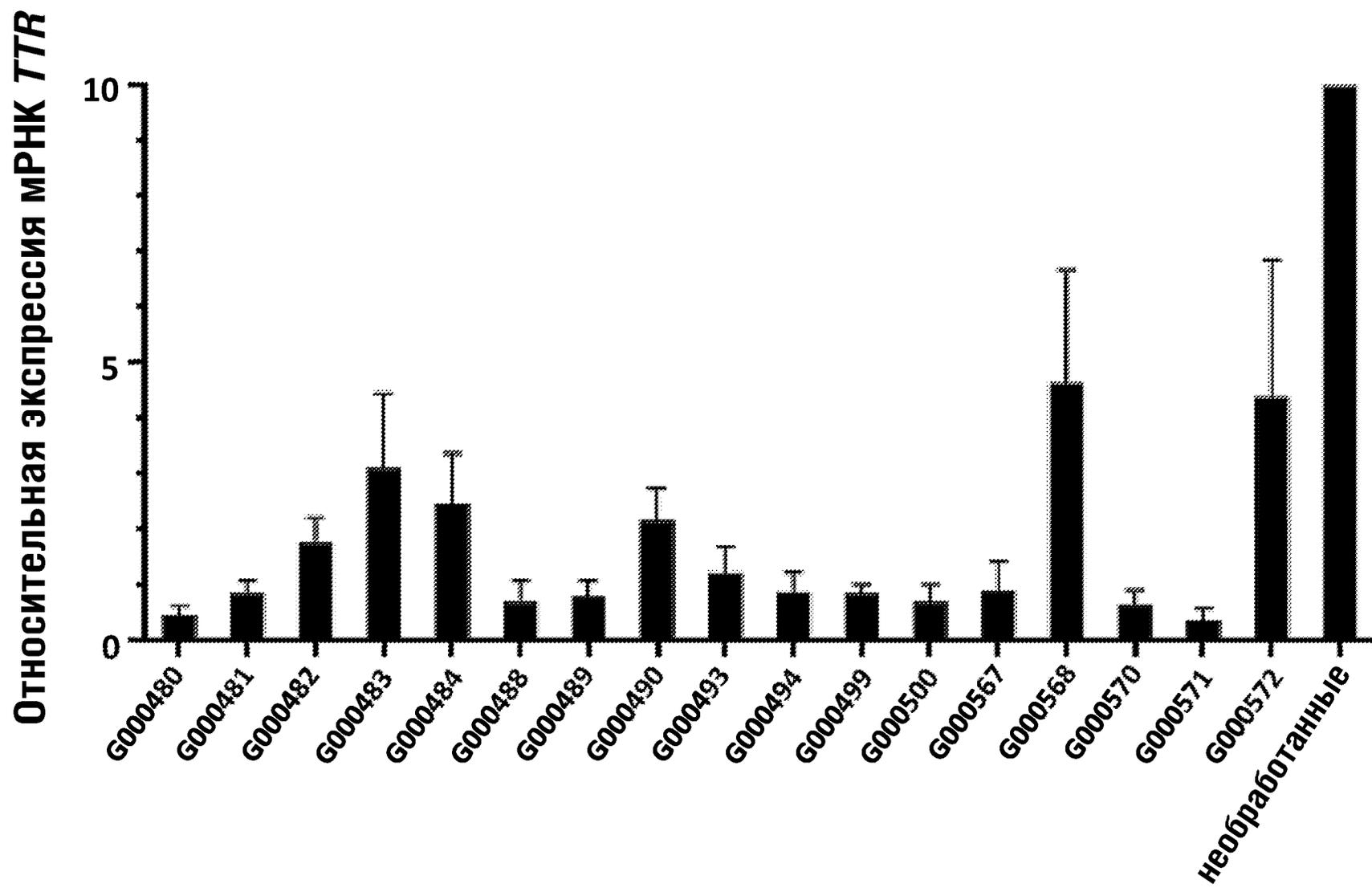
ФИГ.28В



ФИГ.28С



ФИГ.29



ФИГ.30

