

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202191067** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки
2021.11.17

(51) Int. Cl. *C12N 15/113* (2010.01)
A61K 48/00 (2006.01)
C12N 15/90 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2019.10.18

(54) **КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ДЕФИЦИТА АЛЬФА-1-АНТИТРИПСИНА**

(31) 62/747,522

(72) Изобретатель:

(32) 2018.10.18

Финн Джонатан Дуглас, Хуан Хон-Рен, Форджет Энтони, Се Синь (US)

(33) US

(86) PCT/US2019/057092

(74) Представитель:

(87) WO 2020/082047 2020.04.23

Медведев В.Н. (RU)

(71) Заявитель:

**ИНТЕЛЛИА ТЕРАПЬЮТИКС, ИНК.
(US)**

(57) Предложены композиции и способы для экспрессии альфа-1-антитрипсина (AAT) в клетке-хозяине. Также предложены композиции и способы для лечения субъектов, имеющих дефицит альфа-1-антитрипсина (AATD).

202191067
A1

202191067

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-568582EA/019

КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ДЕФИЦИТА АЛЬФА-1-АНТИТРИПСИНА

Данная заявка испрашивает приоритет по предварительной заявке США № 62/747522, поданной 18 октября 2018 г. Описание вышеуказанной заявки в полном объеме включено в данный документ посредством ссылки.

Альфа-1-антитрипсин (ААТ или А1АТ) или сывороточный ингибитор трипсина представляет собой тип ингибитора сериновой протеазы (также называемого серпином), кодируемого геном SERPINA1. ААТ синтезируется и секретируется главным образом гепатоцитами, а его функция состоит в ингибировании активности эластазы нейтрофилов в легких. В отсутствие достаточного количества функционального ААТ эластаза нейтрофилов является неконтролируемой и повреждает альвеолы в легких. Таким образом, мутации в SERPINA1, результатом которых является снижение уровней ААТ или снижение уровней надлежащим образом функционирующего ААТ, приводят к патологии легких. Кроме того, мутации в SERPINA1, которые приводят к выработке неправильно сформированного ААТ, приводят к патологии печени вследствие накопления ААТ в гепатоцитах. Таким образом, недостаточное количество ААТ или неправильно сформированный ААТ вследствие мутации SERPINA1 могут приводить к патологии печени и легких.

Для гена SERPINA1 было описано более сотни аллельных вариантов. В общем случае варианты классифицируют в соответствии с их влиянием на сывороточные уровни ААТ. Например, М-аллели представляют нормальные варианты, ассоциируемые с нормальными сывороточными уровнями ААТ, тогда как Z- и S-аллели являются мутантными вариантами, ассоциированными со сниженными уровнями ААТ. Наличие Z- и S-аллелей связано с дефицитом α 1-антитрипсина (AATD или A1AD), генетическим нарушением, характеризуемым мутациями в гене SERPINA1, которые приводят к выработке аномального ААТ.

Существует много форм и степеней AATD. «Z-вариант» является наиболее распространенным и вызывает серьезное клиническое заболевание как в печени, так и в легких. Z-вариант характеризуется изменением одного нуклеотида в 5'-конце 5-го экзона, что приводит к миссенс-мутации глутаминовой кислоты на лизин в аминокислотной позиции 342 (E342K). Симптомы появляются у пациентов, которые являются как гомозиготными (ZZ), так и гетерозиготными (MZ или SZ) в Z-аллели. Наличие одной или двух Z-аллелей приводит к нестабильности мРНК SERPINA1 и полимеризации и агрегации белка ААТ в гепатоцитах печени. Пациенты, имеющие по меньшей мере одну Z-аллель, демонстрируют повышенную заболеваемость раком печени вследствие накопления агрегированного белка ААТ в печени. Помимо патологии печени, для AATD также характерно то, что по меньшей мере для одной Z-аллели также характерно заболевание легких вследствие снижения количества ААТ в альвеолах и возникающего в

результате ингибирования эластазы нейтрофилов. Распространенность тяжелой ZZ-формы (т. е. гомозиготная экспрессия Z-варианта) составляет 1: 2000 среди населения Северной Европы и 1: 4500 в Соединенных Штатах. Другой распространенной мутацией является S-вариант, результатом которого является белок, который подвергается деградации внутри клетки до секреции. По сравнению с Z-вариантом S-вариант вызывает меньшее снижение сывороточного ААТ и меньший риск заболевания легких. Существует необходимость в нейтрализации негативных эффектов ААТD как в печени, так и в легких.

В настоящем изобретении предложены композиции и способы для экспрессии гетерологичного ААТ в геномном локусе человека, таком как безопасный приемный сайт альбумина, с обеспечением, таким образом, секреции гетерологичного ААТ и снижения негативных эффектов ААТD в легких. В настоящем изобретении также предложены композиции и способы для нокаута эндогенного гена SERPINA1 с устранением, таким образом, выработки мутантных форм ААТ, которые связаны с печеночными симптомами у пациентов с ААТD. В изобретении предложена комбинация нокаута эндогенной аллели SERPINA1 со вставкой гетерологичного ААТ в безопасный приемный сайт для восстановления функции ААТ в клетке или организме.

В частности, в данном документе предложены гидовые РНК для применения в нацеленной вставке последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей ААТ, в безопасный приемный сайт человека, такой как безопасный приемный сайт интрона 1 альбумина. Также предложены донорные конструкции (например, двунаправленные конструкции), содержащие последовательность, кодирующую ААТ, для применения в нацеленной вставке в безопасный приемный сайт человека, такой как безопасный приемный сайт интрона 1 альбумина. В некоторых вариантах осуществления описанную в данном документе гидовую РНК можно использовать в комбинации с РНК-направляемым ДНК-связывающим агентом (например, Cas-нуклеазой) и донорной конструкцией, содержащей последовательность, кодирующую ААТ (например, двунаправленной конструкцией). В некоторых вариантах осуществления донорную конструкцию (например, двунаправленную конструкцию) можно использовать с любой одной или более системами редактирования генов (например, системой CRISPR/Cas; системой цинк-пальцевой нуклеазы (ZFN); системой эффекторной нуклеазы, подобной активатору транскрипции (TALEN)). Предложены следующие варианты осуществления.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ внесения нуклеиновой кислоты SERPINA1 в клетку или популяцию клеток, включающий введение: i) конструкции нуклеиновой кислоты, содержащей кодирующую последовательность гетерологичного белка ААТ; ii) РНК-направляемого ДНК-связывающего агента; и iii) гидовой РНК (гРНК) альбумина, содержащей последовательность, выбранную из: а) последовательности, которая по меньшей мере на 95%, 90%, 85%, 80% или 75% идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 8, 13, 19, 28, 29, 31, 32, 33; b) по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ

ID NO: 2, 8, 13, 19, 28, 29, 31, 32, 33; c) последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 34, 40, 45, 51, 60, 61, 63, 64, 65, 66, 72, 77, 83, 92, 93, 95, 96 и 97; d) последовательности, которая по меньшей мере на 95%, 90%, 85%, 80% или 75% идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2-33; e) по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2-33; f) последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 34-97; и g) последовательности, комплементарной 15 последовательным нуклеотидам +/- 10 нуклеотидам геномных координат, приведенных для SEQ ID NO: 2-33, с внесением, таким образом, нуклеиновой кислоты SERPINA1 в клетку или популяцию клеток. В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ экспрессии ААТ у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение: i) конструкции нуклеиновой кислоты, содержащей кодирующую последовательность гетерологичного белка ААТ; ii) РНК-направляемого ДНК-связывающего агента; и iii) гидовой РНК (гРНК) альбумина, содержащей последовательность, выбранную из: a) последовательности, которая по меньшей мере на 95%, 90%, 85%, 80% или 75% идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 8, 13, 19, 28, 29, 31, 32, 33; b) по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 8, 13, 19, 28, 29, 31, 32, 33; c) последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 34, 40, 45, 51, 60, 61, 63, 64, 65, 66, 72, 77, 83, 92, 93, 95, 96 и 97; d) последовательности, которая по меньшей мере на 95%, 90%, 85%, 80% или 75% идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2-33; e) по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2-33; f) последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 34-97; и g) последовательности, комплементарной 15 последовательным нуклеотидам +/- 10 нуклеотидам геномных координат, приведенных для SEQ ID NO: 2-33, с экспрессией, таким образом, ААТ у нуждающегося в этом субъекта.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ лечения дефицита альфа-1-антитрипсина (ААТД) у нуждающегося в белке ААТ субъекта, включающий введение: i) конструкции нуклеиновой кислоты, содержащей кодирующую последовательность гетерологичного белка ААТ; ii) РНК-направляемого ДНК-связывающего агента; и iii) гидовой РНК (гРНК) альбумина, содержащей последовательность, выбранную из: a) последовательности, которая по меньшей мере на 95%, 90%, 85%, 80% или 75% идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 8, 13, 19, 28, 29, 31, 32, 33; b) по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 8, 13, 19, 28, 29, 31, 32, 33; c) последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 34, 40, 45, 51, 60, 61, 63, 64, 65, 66, 72, 77, 83, 92, 93, 95, 96 и 97; d) последовательности, которая по меньшей мере на 95%, 90%, 85%, 80% или 75%

идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2-33; e) по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2-33; f) последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 34-97; и g) последовательности, комплементарной 15 последовательным нуклеотидам +/- 10 нуклеотидам геномных координат, приведенных для SEQ ID NO: 2-33, осуществляя, таким образом, лечение AATD у субъекта.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ повышения секреции ААТ из клетки или популяции клеток печени, включающий введение: i) конструкции нуклеиновой кислоты, содержащей кодирующую последовательность гетерологичного белка ААТ; ii) РНК-направляемого ДНК-связывающего агента; и iii) гидовой РНК (гРНК) альбумина, содержащей последовательность, выбранную из: а) последовательности, которая по меньшей мере на 95%, 90%, 85%, 80% или 75% идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 8, 13, 19, 28, 29, 31, 32, 33; b) по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 8, 13, 19, 28, 29, 31, 32, 33; c) последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 34, 40, 45, 51, 60, 61, 63, 64, 65, 66, 72, 77, 83, 92, 93, 95, 96 и 97; d) последовательности, которая по меньшей мере на 95%, 90%, 85%, 80% или 75% идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2-33; e) по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2-33; f) последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 34-97; и g) последовательности, комплементарной 15 последовательным нуклеотидам +/- 10 нуклеотидам геномных координат, приведенных для SEQ ID NO: 2-33, с повышением, таким образом, секреции ААТ из клетки или популяции клеток печени.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

На Фиг. 1А-1С приведены результаты *in vitro* скрининга двунаправленных конструкций по целевым сайтам в первичных гепатоцитах мышей. На Фиг. 1А приведено схематическое изображение исследуемого вектора. На Фиг. 1В проиллюстрированы различные уровни редактирования при применении разных исследуемых гРНК (ID направляющих указаны по оси x). На Фиг. 1С проиллюстрировано, что высокий уровень редактирования не обязательно приводит к более эффективной экспрессии трансгена.

На Фиг. 2А-2С проиллюстрированы результаты *in vitro* скрининга двунаправленных конструкций среди целевых сайтов в первичных гепатоцитах яванских макаков. На Фиг. 2А проиллюстрированы различные уровни редактирования для каждой из исследуемых комбинаций. На Фиг. 2В и Фиг. 2С проиллюстрировано, что значительные уровни редактирования (в терминах образования инделей в конкретном целевом сайте) не обязательно приводят к более эффективной вставке или экспрессии трансгенов.

На Фиг. 3А-3С проиллюстрированы результаты *in vitro* скрининга

двунаправленных конструкций среди целевых сайтов в первичных гепатоцитах человека. На Фиг. 3А проиллюстрированы различные уровни редактирования для каждой из исследуемых комбинаций. На Фиг. 3В и Фиг. 3С проиллюстрировано, что значительные уровни редактирования (в терминах образования инделей в конкретном целевом сайте) не обязательно приводят к более эффективной вставке или экспрессии трансгенов.

На Фиг. 4А-4С проиллюстрированы результаты *in vivo* исследований вставки hSERPINA1 в локус mAlbumin. На Фиг. 4А проиллюстрированы результаты при применении разных исследуемых гРНК (указанных по оси x). На Фиг. 4В проиллюстрированы сывороточные уровни hA1AT через 1, 2 и 4 недели после введения дозы. На Фиг. 4С проиллюстрирована положительная корреляция между уровнями экспрессии, измеренными в ОЕЛ, для заданной направляющей из *in vitro* экспериментов и уровнями экспрессии трансгена hA1AT *in vivo*.

На Фиг. 5А-5D проиллюстрированы результаты *in vivo* нокдауна трансгена hSERPINA1 PiZ и вставки hSERPINA1 в локус mAlbumin. На Фиг. 5А приведены условия редактирования для каждой исследуемой группы. На Фиг. 5В проиллюстрировано образование инделей в варианте hSERPINA1 PiZ, который был мишенью на стадии 1. На Фиг. 5С проиллюстрировано образование инделей в локусе альбумина, который был мишенью на стадии 2. На Фиг. 5D проиллюстрированы уровни белка hA1AT в сыворотке в разные моменты времени, измеренные методом ELISA, а также уровни hA1AT, измеренные в человеческой плазме.

На Фиг. 6 приведены относительные единицы люциферазы из анализа обнаружения на основании флуоресценции люциферазы.

На Фиг. 7 приведены результаты *in vitro* скрининга двунаправленной конструкции по целевым сайтам в первичных гепатоцитах мышей при применении различных огРНК. На Фиг. 7 проиллюстрировано, что при применении различных огРНК были зарегистрированы различные уровни экспрессии.

На Фиг. 8 приведены результаты *in vitro* скрининга двунаправленной конструкции по целевым сайтам в первичных гепатоцитах крыс. На Фиг. 8 проиллюстрирована вставка с использованием определенных гидовых РНК (относительные единицы люциферазы).

На Фиг. 9 проиллюстрирована вставка с использованием различных концентраций гидовых РНК.

На Фиг. 10 проиллюстрированы уровни ААТ при применении различных конструкций AAV.

На Фиг. 11 проиллюстрированы уровни ААТ в различные моменты времени, измеренные методом ELISA.

На Фиг. 12 проиллюстрировано образование инделей в локусе альбумина.

На Фиг. 13А проиллюстрированы уровни ААТ в различные моменты времени, измеренные методом ELISA. На Фиг. 13В проиллюстрированы уровни ААТ в различные моменты времени, измеренные методом ЖХ-МС/МС.

На Фиг. 14А и Фиг. 14В проиллюстрированы уровни экспрессии ААТ с

различными концентрациями ЛНЧ или AAV. На Фиг. 14С и Фиг. 14D проиллюстрировано образование инделей при применении различных концентраций ЛНЧ или AAV.

На Фиг. 15 приведено схематическое изображение двух двунаправленных AAV-конструкций ААТ.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Далее будет приведено подробное описание определенных вариантов осуществления изобретения, примеры которых проиллюстрированы на прилагаемых графических материалах. Хотя представленные идеи описаны в сочетании с различными вариантами осуществления, следует понимать, что это не подразумевает ограничения изобретения данными вариантами осуществления. Наоборот, подразумевается, что представленные идеи охватывают все альтернативные варианты, модификации и эквиваленты, которые могут быть предположены специалистами в данной области техники.

Перед подробным описанием представленных идей следует понимать, что изобретение не ограничено конкретными композициями или этапами процессов, поскольку они могут варьироваться. Следует отметить, что, в контексте данного описания и прилагаемых вариантов осуществления форма единственного числа включает отсылку на множественное число, если из контекста не следует иное. Таким образом, например, ссылка на «конъюгат» включает множество конъюгатов, а ссылка на «клетку» включает множество клеток и т. п. В контексте данного документа термин «включать» и его грамматические варианты не подразумевают ограничения, поэтому перечисление элементов в списке не исключает другие подобные элементы, которыми можно заменять или которые можно добавлять к перечисленным элементам.

Числовые диапазоны включают числа, определяющие диапазон. Подразумевается, что измеренные и измеряемые значения являются приблизительными с учетом значимых знаков и погрешности, связанной с измерением. Также использование терминов «содержать», «содержит», «содержащий», «включать», «включает» и «включающий» не подразумевает ограничения. Следует понимать, что вышеприведенное общее описание и нижеприведенное подробное описание являются лишь иллюстративными и пояснительными и не ограничивают идеи изобретения.

Если специально не указано в описании, варианты осуществления в описании, которые указаны как «содержащие» различные компоненты, также рассматриваются как «состоящие из» или «состоящие преимущественно из» перечисленных компонентов; варианты осуществления в описании, которые указаны как «состоящие из» различных компонентов, также рассматриваются как «содержащие» или «состоящие преимущественно из» перечисленных компонентов; и варианты осуществления в описании, которые указаны как «состоящие преимущественно из» различных компонентов, также рассматриваются как «состоящие из» или «содержащие» перечисленные компоненты (эта взаимозаменяемость не применима к использованию

этих терминов в вариантах осуществления). Термин «или» используется во включительном смысле, т. е. он эквивалентен «и/или», если из контекста четко не следует иное.

Термин «около», используемый перед перечнем, модифицирует каждый элемент перечня. Термин «около» или «приблизительно» означает допустимую ошибку для конкретного значения, определяемую специалистом в данной области техники, которая частично зависит от того, как данное значение измеряют или определяют.

Заголовки разделов, используемые в данном документе, приведены исключительно в организационных целях, и их не следует толковать как ограничивающие каким-либо образом предмет изобретения. В случае, если какой-либо материал, включенный посредством ссылки, противоречит любому термину, определенному в этом описании, или любому другому явному содержанию этого описания, приоритет имеет это описание.

Определения

Если не указано иное, в контексте данного документа следующие термины и выражения имеют следующие значения:

В контексте данного документа «полинуклеотид» и «нуклеиновая кислота» обозначают мультимерное соединение, содержащее нуклеозиды или аналоги нуклеозидов, которые состоят из азотистых гетероциклических оснований или аналогов оснований, связанных вместе вдоль остова, включая традиционные РНК, ДНК, смешанные РНК-ДНК и полимеры, которые являются их аналогами. «Остов» нуклеиновой кислоты может состоять из ряда связей, включая одну или более сахарно-фосфодиэфирных связей, связей пептид - нуклеиновая кислота («пептидные нуклеиновые кислоты» или ПНК; РСТ № WO 95/32305), тиофосфатных связей, метилфосфонатных связей или их комбинаций. Сахарные фрагменты нуклеиновой кислоты могут представлять собой рибозу, дезоксирибозу или аналогичные соединения с необязательными заменами, например, 2'-метокси- или 2'-галогенидными заменами. Азотистые основания могут представлять собой традиционные основания (A, G, C, T, U), их аналоги (например, модифицированные уридины, такие как 5-метоксиуридин, псевдоуридин или N1-метилпсевдоуридин или другие); инозин; производные пуринов или пиримидинов (например, N⁴-метилдезоксигуанозин, деаза- или азапурины, деаза- или азапиримидины, пиримидиновые основания с группами заместителей в позиции 5 или 6 (например, 5-метилцитозин), пуриновые основания с заместителем в позициях 2, 6 или 8, 2-амино-6-метиламинопурин, O⁶-метилгуанин, 4-тиопиримидины, 4-аминопиримидины, 4-диметилгидразинпиримидины и O⁴-алкилпиримидины; патент США № 5378825 и РСТ № WO 93/13121). Общее обсуждение смотрите в *The Biochemistry of the Nucleic Acids* 5-36, Adams et al., ed., 11th ed., 1992). Нуклеиновые кислоты могут содержать один или более «абазических» остатков, остов которых не содержит азотистых оснований для позиции(й) полимера (патент США № 5585481). Нуклеиновая кислота может содержать только традиционные сахара, основания и связи РНК или ДНК или может включать как традиционные компоненты, так и замены (например, традиционные нуклеозиды с 2'-

метокси-заместителями или полимеры, содержащие как традиционные нуклеозиды, так и один или более нуклеозидных аналогов). Нуклеиновая кислота включает «закрытую нуклеиновую кислоту» (ЗНК), аналог, содержащий один или более нуклеотидных мономеров ЗНК с бициклическим фуранозным звеном, замкнутым в имитирующую РНК сахарную конформацию, что повышает аффинность гибридизации к комплементарным последовательностям РНК и ДНК (Vester and Wengel, 2004, *Biochemistry* 43(42):13233-41). РНК и ДНК имеют разные сахарные фрагменты и могут отличаться наличием урацила или его аналогов в РНК и тимина или его аналогов в ДНК.

Термины «гидовая (направляющая) РНК», «гРНК» и просто «направляющая» взаимозаменяемо используют в данном документе для обозначения направляющей, которая содержит направляющую последовательность, например, сгРНК (также известную как CRISPR РНК) или комбинацию сгРНК и трРНК (также известную как tracrРНК). сгРНК и трРНК могут быть связаны в виде одной молекулы РНК (одинарная гидовая РНК, огРНК) или, например, в виде двух отдельных молекул РНК (двойная гидовая РНК, дгРНК). Термин «гидовая РНК» или «гРНК» относится к каждому типу. трРНК может представлять собой последовательность природного происхождения или последовательность трРНК с модификациями или вариациями по сравнению с последовательностями природного происхождения. Гидовые РНК, такие как огРНК или дгРНК, могут включать модифицированные РНК, как описано в данном документе.

В контексте данного документа «направляющая последовательность» относится к последовательности в гидовой РНК, которая является комплементарной целевой последовательности, а ее функция состоит в направлении гидовой РНК к целевой последовательности для связывания или модификации (например, расщепления) РНК-направляемым ДНК-связывающим агентом. «Направляющая последовательность» также может называться «нацеливающей последовательностью» или «спейсерной последовательностью». Направляющая последовательность может иметь длину в 20 пар оснований, например, в случае *Streptococcus pyogenes* (т. е. *Spy Cas9*) и родственных гомологов/ортологов *Cas9*. Также в качестве направляющих можно использовать более короткие или более длинные последовательности, например, длиной 15, 16, 17, 18, 19, 21, 22, 23, 24 или 25 нуклеотидов. Например, в некоторых вариантах осуществления направляющая последовательность содержит по меньшей мере 15, 16, 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов направляющей последовательности альбумина, выбранной из SEQ ID NO: 2-33, или направляющей последовательности *SERPINA1*, выбранной из SEQ ID NO: 1000-1128. В некоторых вариантах осуществления целевая последовательность находится, например, в гене или хромосоме и является комплементарной направляющей последовательности. В некоторых вариантах осуществления степень комплементарности или идентичности между направляющей последовательностью и соответствующей ей целевой последовательностью может составлять около 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%. Например, в некоторых вариантах осуществления направляющая последовательность содержит последовательность с 75%, 80%, 85%, 90%,

95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью с по меньшей мере 15, 16, 17, 18, 19 или 20 смежными нуклеотидами направляющей последовательности альбумина, выбранной из SEQ ID NO: 2-33, или направляющей последовательности SERPINA1, выбранной из SEQ ID NO: 1000-1128. В некоторых вариантах осуществления направляющая последовательность и целевая область могут быть на 100% комплементарными или идентичными. В других вариантах осуществления направляющая последовательность и целевая область могут содержать по меньшей мере одно несовпадение. Например, направляющая последовательность и целевая последовательность могут содержать 1, 2, 3 или 4 несовпадения, при этом общая длина целевой последовательности составляет по меньшей мере 15, 16, 17, 18, 19, 20 или более пар оснований. В некоторых вариантах осуществления направляющая последовательность и целевая последовательность могут содержать 1-4 несовпадения, при этом направляющая последовательность содержит по меньшей мере 15, 16, 17, 18, 19, 20 или более нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления направляющая последовательность и целевая область могут содержать 1, 2, 3 или 4 несовпадения, при этом направляющая последовательность содержит 20 нуклеотидов.

Целевые последовательности для РНК-направляемых ДНК-связывающих агентов включают как положительные, так и отрицательные цепи геномной ДНК (т. е. заданную последовательность и обратную комплементарную последовательность), поскольку субстратом нуклеиновой кислоты для РНК-направляемого ДНК-связывающего агента является двухцепочечная нуклеиновая кислота. Соответственно, когда говорят, что направляющая последовательность «является комплементарной целевой последовательности», следует понимать, что направляющая последовательность может направлять гидовую РНК для связывания со смысловой или антисмысловой цепью (например, обратной комплементарной последовательностью) целевой последовательности. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления, в которых направляющая последовательность связывает обратную комплементарную последовательность целевой последовательности, направляющая последовательность идентична определенным нуклеотидам целевой последовательности (например, целевой последовательности, не содержащей РАМ), за исключением замены U на T в гидовой последовательности.

В контексте данного документа «РНК-направляемый ДНК-связывающий агент» означает полипептид или комплекс полипептидов, обладающих активностью связывания РНК и ДНК, или ДНК-связывающую субъединицу такого комплекса, причем ДНК-связывающая активность является специфической для последовательности и зависит от последовательности РНК. Термин «РНК-направляемый ДНК-связывающий агент» также включает нуклеиновые кислоты, кодирующие такие полипептиды. Типовые РНК-направляемые ДНК-связывающие агенты включают кливазы/никазы Cas. Типовые РНК-направляемые ДНК-связывающие агенты могут включать инактивированные формы («ДНК-связывающие агенты dCas»), например, если эти агенты модифицированы с

возможностью расщепления ДНК, например, посредством слияния с доменом расщепления FokI. В контексте данного документа термин «Cas-нуклеаза» включает Cas-кливазы и Cas-никазы. Cas-кливазы и Cas-никазы включают комплекс Csm или Cmr системы CRISPR типа III, его субъединицу Cas10, Csm1 или Cmr2, комплекс Cascade системы CRISPR типа I, ее субъединицу Cas3 и Cas-нуклеазы 2 класса. В контексте данного документа «Cas-нуклеаза 2 класса» представляет собой одноцепочечный полипептид с РНК-направляемой ДНК-связывающей активностью. Cas-нуклеазы 2 класса включают кливазы/никазы Cas 2 класса (например, варианты H840A, D10A или N863A), которые дополнительно обладают активностью РНК-направляемых кливаз или никаз ДНК и ДНК-связывающих агентов dCas класса 2, в которых активность кливазы/никазы инактивирована), если эти агенты модифицированы с возможностью расщепления ДНК. Cas-нуклеазы 2 класса включают, например, белки Cas9, Cpf1, C2c1, C2c2, C2c3, HF Cas9 (например, варианты N497A, R661A, Q695A, Q926A), НураCas9 (например, варианты N692A, M694A, Q695A, H698A), eSPCas9(1,0) (например, варианты K810A, K1003A, R1060A) и eSPCas9(1,1) (например, например K848A, K1003A, R1060A) и их модификации. Белок Cpf1, Zetsche et al., Cell, 163: 1-13 (2015) содержит RuvC-подобный нуклеазный домен. Последовательности Cpf1 Zetsche в полном объеме включены посредством ссылки. Смотрите, например, Zetsche, таблицы S1 и S3. Смотрите, например, Makarova et al., Nat Rev Microbiol, 13(11): 722-36 (2015); Shmakov et al., Molecular Cell, 60:385-397 (2015). В контексте данного документа доставка РНК-направляемого ДНК-связывающего агента (например, Cas-нуклеазы, Cas9-нуклеазы или Cas9-нуклеазы *S. pyogenes*) включает доставку полипептида или мРНК.

В контексте данного документа термин «рибонуклеопротеин» (РНП) или «комплекс РНП» относится к гидовой РНК вместе с РНК-направляемым ДНК-связывающим агентом, таким как Cas-нуклеаза, например, Cas-кливаза, Cas-никаза или ДНК-связывающий агент dCas (например, Cas9). В некоторых вариантах осуществления гидовая РНК направляет РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, такой как Cas9, к целевой последовательности, агент связывается с целевой последовательностью, а гидовая РНК гибридизуется с ней; в случаях, когда агент представляет собой кливазу или никазу, за связыванием может следовать расщепление или создание одноцепочечного разрыва.

В контексте данного документа считается, что первая последовательность «содержит последовательность с по меньшей мере X % идентичности со» второй последовательностью, если выравнивание первой последовательности относительно второй последовательностью показывает, что X % или более позиций второй последовательности совпадают с первой последовательностью. Например, последовательность AAGA содержит последовательность со 100% идентичности с последовательностью AAG, поскольку выравнивание даст 100% идентичности в том смысле, что присутствуют совпадения со всеми тремя позициями второй последовательности. Различия между РНК и ДНК (в общем случае замена уридина на тимидин или наоборот) и наличие аналогов нуклеозидов, таких как модифицированные

уридины, не влияют на различия в идентичности или комплементарности среди полинуклеотидов при условии, что соответствующие нуклеотиды (такие как тимидин, уридин или модифицированный уридин) имеют один и тот же комплемент (например, аденозин для всех из тимидина, уридина или модифицированного уридина; другим примером является цитозин и 5-метилцитозин, которые оба содержат гуанозин или модифицированный гуанозин в качестве комплемента). Таким образом, например, последовательность 5'-AXG, где X представляет собой любой модифицированный уридин, такой как псевдоуридин, N1-метил-псевдоуридин или 5-метоксиуридин, считается на 100% идентичной AUG в том смысле, что они обе полностью комплементарны одной и той же последовательности (5'-CAU). Типовыми алгоритмами выравнивания являются алгоритмы Смита - Уотермана и Нидлмана - Вунша, которые хорошо известны в данной области техники. Специалист в данной области поймет, какой выбор алгоритма и настроек параметров подходит для заданной пары последовательностей, подлежащих выравниванию; в случае последовательностей в целом одинаковой длины и с ожидаемой идентичностью > 50% для аминокислот или > 75% для нуклеотидов в общем случае подходит алгоритм Нидлмана - Вунша с настройками интерфейса алгоритма Нидлмана - Вунша по умолчанию, предоставленный EBI на веб-сервере www.ebi.ac.uk.

В контексте данного документа первая последовательность считается «на X % комплементарной» второй последовательности, если X % оснований первой последовательности спариваются со второй последовательностью. Например, первая последовательность 5'AAGA3' является на 100% комплементарной второй последовательности 3'TTCT5', а вторая последовательность является на 100% комплементарной первой последовательности. В некоторых вариантах осуществления первая последовательность 5'AAGA3' является на 100% комплементарной второй последовательности 3'TTCTGTGA5', тогда как вторая последовательность является на 50% комплементарной первой последовательности.

В контексте данного документа термин «мРНК» относится к полинуклеотиду, который полностью или преимущественно представляет собой РНК или модифицированную РНК и содержит открытую рамку считывания, которая может транслироваться в полипептид (т. е. может служить субстратом для трансляции рибосомой и аминоацелированными тРНК). мРНК может содержать фосфатно-сахарный остов, включая остатки рибозы или их аналоги, например, остатки 2'-метоксирибозы. В некоторых вариантах осуществления сахара фосфатно-сахарного остова мРНК состоят преимущественно из остатков рибозы, остатков 2'-метоксирибозы или их комбинации.

Типовые направляющие последовательности, применимые в описанных в данном документе композициях гидовых РНК и способах, приведены в таблице 1, таблице 2 и по всему объему заявки.

В контексте данного документа «индели» относятся к инсерционным/делеционным мутациям, состоящим из ряда нуклеотидов, которые вставлены или удалены в сайте

двухцепочечных разрывов (ДЦР) в целевой нуклеиновой кислоте.

В контексте данного документа термин «гетерологичный альфа-1-антитрипсин» используют взаимозаменяемо с «гетерологичным ААТ», или «гетерологичным А1АТ», или «трансгеном ААТ/А1АТ», что представляет собой генный продукт гена SERPINA1, являющийся гетерологичным по отношению к сайту его вставки. В некоторых вариантах осуществления ген SERPINA1 является экзогенным. Последовательность белка человеческого ААТ дикого типа доступна на NCBI NP_000286; последовательность гена доступна на NCBI NM_000295. кДНК человеческого ААТ дикого типа была секвенирована (смотрите, например, Long et al., “Complete sequence of the cDNA for human alpha 1-antitrypsin and the gene for the S variant,” *Biochemistry* 1984) и кодирует молекулу-предшественницу, содержащую сигнальный пептид и зрелый пептид ААТ. Были изучены характеристики доменов пептида, которые отвечают за внутриклеточное нацеливание, присоединение углеводов, каталитическую функцию, ингибирующую протеазы активность и т. д. (смотрите, например, Kalsheker, “Alpha 1-antitrypsin: structure, function and molecular biology of the gene,” *Biosci Rep.* 1989; Matamala et al., “Identification of Novel Short C-Terminal Transcripts of Human SERPINA1 Gene,” *PLoS One* 2017; Niemann et al., “Isolation and serine protease inhibitory activity of the 44-residue, C-terminal fragment of alpha 1-antitrypsin from human placenta,” *Matrix* 1992). В контексте данного документа гетерологичный ААТ включает ААТ-предшественника, зрелый ААТ и его варианты и фрагменты, например, функциональные фрагменты, например, фрагменты, которые сохраняют ингибирующую протеазы активность (например, по меньшей мере на 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 92%, 94%, 96%, 98%, 99% или 100% по сравнению ААТ дикого типа, например, по данным измерения в коммерчески доступном анализе ингибирования протеазы или анализе ингибирования эластазы нейтрофилов (HNE) человека). В некоторых вариантах осуществления функциональный фрагмент встречается в природе, например, представляет собой короткий С-концевой фрагмент. В некоторых вариантах осуществления функциональный фрагмент генетически сконструирован, например, представляет собой гиперактивный функциональный фрагмент. Примеры белковой последовательности ААТ описаны в данном документе (например, SEQ ID NO: 700 или SEQ ID NO: 702). В контексте данного документа гетерологичный ААТ также включает вариант ААТ, например, вариант, который обладает повышенной ингибирующей протеазы активностью по сравнению с ААТ дикого типа. В контексте данного документа гетерологичный ААТ также включает вариант, который на 80%, 85%, 90%, 93%, 95%, 97%, 99% идентичен SEQ ID NO: 700, имеющей функциональную активность, например, по меньшей мере 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 92%, 94%, 96%, 98%, 99%, 100% или более активности по сравнению с ААТ дикого типа, например, по данным анализа ингибирования HNE. В контексте данного документа гетерологичный ААТ также включает фрагмент, который обладает функциональной активностью, например, по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 92%, 94%, 96%, 98%, 99%, 100% или более активности по сравнению с ААТ дикого типа, например, по данным анализа ингибирования HNE. В

контексте данного документа гетерологичный ААТ относится к ААТ, например, функциональному ААТ, применимому в лечении ААТD, который может представлять собой ААТ дикого типа или его вариант, применимый в лечении ААТD.

В контексте данного документа термин «гетерологичный ген» относится к гену, который был внесен в качестве экзогенного источника в сайт в геноме клетки-хозяина (например, в геномный локус, такой как безопасный приемный локус, включая сайт интрона 1 альбумина). Полипептид, экспрессируемый из такого гетерологичного гена, называется «гетерологичным полипептидом». Гетерологичный ген может иметь природное происхождение или быть сконструированным, и может быть дикого типа или вариантным. Гетерологичный ген может содержать нуклеотидные последовательности, отличные от последовательности, кодирующей гетерологичный полипептид. Гетерологичный ген может представлять собой ген, который встречается в природе в геноме хозяина в виде гена дикого типа или варианта (например, мутантного). Например, хотя клетка-хозяин содержит представляющий интерес ген (как ген дикого типа или вариант), тот же ген или его вариант можно вносить в качестве экзогенного источника, например, для экспрессии в локусе с высокой экспрессией. Гетерологичный ген также может представлять собой ген, который не встречается в природе в геноме хозяина, или который экспрессирует гетерологичный полипептид, который в природе не встречается в геноме хозяина. Термины «гетерологичный ген», «экзогенный ген» и «трансген» используют взаимозаменяемо. В некоторых вариантах осуществления гетерологичный ген или трансген содержит экзогенную последовательность нуклеиновой кислоты, например, последовательность нуклеиновой кислоты не является эндогенной для клетки-реципиента. В определенных вариантах осуществления гетерологичный ген может содержать последовательность нуклеиновой кислоты ААТ, которая в природе не встречается в клетке-реципиенте. Например, гетерологичный ААТ может быть гетерологичным в отношении сайта его вставки и в отношении клетки-реципиента.

В контексте данного документа термин «мутантный SERPINA1» или «мутантная аллель SERPINA1» относится к последовательности SERPINA1, имеющей изменение в нуклеотидной последовательности SERPINA1 по сравнению с последовательностью дикого типа (ID гена по NCBI: 5265; NCBI NM_000295; Ensembl: Ensembl:ENSG00000197249). В некоторых вариантах осуществления мутантная аллель SERPINA1 кодирует нефункциональный и/или несекретируемый белок ААТ.

«ААТD» или «А1AD» относится к дефициту альфа-1-антитрипсина. ААТD включает заболевания и нарушения, вызванные рядом разных генетических мутаций в SERPINA1. ААТD может относиться к заболеванию, при котором экспрессируются сниженные уровни функционального ААТ (например, менее 100%, 90%, 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20%, 10% или 5% экспрессии гена или белка ААТ по сравнению с контрольным образцом, например, по данным нефелометрии или иммунотурбидиметрии, например, ААТ менее чем около 100 мг/дл, 90 мг/дл, 80 мг/дл, 70 мг/дл, 60 мг/дл, 50 мг/дл, 40 мг/дл, 30 мг/дл, 20 мг/дл, 10 мг/дл или 5 мг/дл в сыворотке), функциональный ААТ не

экспрессируется или экспрессируется мутантный или не функциональный ААТ (например, образует агрегаты и/или не способен к секреции, и/или имеет сниженную ингибирующую протеазы активность). Смотрите, например, Greulich and Vogelmeier, *The Adv Respir Dis* 2016. В некоторых вариантах осуществления ААТД относится к заболеванию, при котором наблюдается агрегация и/или накопление ААТ внутри клетки, например, в гепатоците, и отсутствие его секреции, например, в кровоток, посредством чего он может быть доставлен в легкие для осуществления функции ингибитора протеаз. В некоторых вариантах осуществления ААТД можно обнаружить путем окрашивания PASD срезов ткани печени, например, для измерения агрегации. В некоторых вариантах осуществления ААТД можно обнаружить по снижению ингибированию эластазы нейтрофилов, например, в легких.

В контексте данного документа «целевая последовательность» относится к последовательности нуклеиновой кислоты в целевом гене, которая комплементарна направляющей последовательности гРНК. Взаимодействие целевой последовательности и направляющей последовательности заставляет РНК-направляемый ДНК-связывающий агент связываться и потенциально создавать одноцепочечный разрыв или расщепление (в зависимости от активности агента) внутри целевой последовательности.

В контексте данного документа «нормальные» или «здоровые» индивиды включают тех индивидов, у которых отсутствуют ААТД-ассоциированные аллели, например, ААТД-ассоциированными аллелями являются ZZ, MZ или SZ.

В контексте данного документа «лечение» относится к любому введению или применению терапевтического средства для лечения заболевания или нарушения у субъекта и включает ингибирование заболевания, прекращение его развития, облегчение одного или более симптомов заболевания, излечение заболевания или предотвращение повторного появления одного или более симптомов заболевания. ААТД может быть связан с болезнью легких и/или болезнью печени; свистящим дыханием или одышкой; повышенным риском инфекций легких; хронической обструктивной болезнью легких (ХОБЛ); бронхитом, астмой, диспноэ; циррозом; желтухой новорожденных; паникулитом; хроническим кашлем и/или выделением слизи; повторяющимися простудами; пожелтением кожи или белков глаз; вздутием живота или отеком ног. Например, лечение ААТД может включать смягчение симптомов ААТД, например, печеночных и/или легочных симптомов. В некоторых вариантах осуществления лечение относится к повышению сывороточных уровней ААТ, например, до защитных уровней. В некоторых вариантах осуществления лечение относится к повышению сывороточных уровней ААТ, например, до нормального диапазона. В некоторых вариантах осуществления лечение относится к повышению сывороточных уровней ААТ, например, выше 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100 мг/дл, например, по данным измерений методом нефелометрии или иммунотурбидиметрии и с применением очищенного стандарта. В некоторых вариантах осуществления лечение относится к улучшению исходного сывороточного ААТ по сравнению с контролем, например, до и после лечения. В

некоторых вариантах осуществления лечение относится к улучшению гистологической градации связанного с ААТД заболевания печени, например, на 1, 2, 3 или более пунктов, по сравнению с контролем, например, до и после лечения. В некоторых вариантах осуществления лечение относится к улучшению оценки фиброза по шкале Исхака по сравнению с контролем, например, до и после лечения. В некоторых вариантах осуществления лечение относится к улучшению генотипического сывороточного уровня, легочной функции ААТ, результатов спирометрического исследования, рентгенографии легких, КТ-сканирования легких, анализа крови на печеночную функцию и/или ультразвукового исследования печени.

В контексте данного документа «нокдаун» относится к снижению экспрессии конкретного генного продукта (например, белка, мРНК или обоих). Нокдаун белка можно определить, например, путем обнаружения белка, секретируемого тканью или популяцией клеток (например, в сыворотке или клеточной среде) или путем обнаружения общего клеточного количества белка из представляющей интерес ткани или популяции клеток. Способы определения нокдауна мРНК известны и включают секвенирование мРНК, выделенной из представляющей интерес ткани или популяции клеток. В некоторых вариантах осуществления «нокдаун» может относиться к некоторому снижению экспрессии конкретного генного продукта, например, снижению количества транскрибируемой мРНК или снижению количества белка, экспрессируемого или секретируемого популяцией клеток (включая *in vivo* популяции, такие как находятся в тканях). В некоторых вариантах осуществления способы по изобретению позволяют осуществлять «нокдаун» эндогенного ААТ в одной или более клетках (например, в популяции клеток, включая *in vivo* популяции, такие как находятся в тканях). Релевантные клетки включают клетки, которые способны вырабатывать ААТ. В некоторых вариантах осуществления способы по изобретению позволяют осуществлять нокдаун эндогенной мутантной аллели SERPINA1 и/или эндогенной аллели SERPINA1 дикого типа (например, у MZ-гетерозиготного индивида).

В контексте данного документа «нокаут» относится к снижению экспрессии конкретного белка в клетке. Нокаут можно определить путем обнаружения степени секреции белка из ткани или популяции клеток (например, в сыворотке или клеточной среде) или путем обнаружения общего клеточного количества белка в ткани или популяции клеток. Релевантные клетки включают клетки, которые способны вырабатывать ААТ. В некоторых вариантах осуществления способы по изобретению позволяют осуществлять «нокаут» эндогенного ААТ в одной или более клетках (например, в популяции клеток, включая *in vivo* популяции, такие как находятся в тканях). В некоторых вариантах осуществления способы по изобретению позволяют осуществлять нокаут эндогенной мутантной аллели SERPINA1 и/или эндогенной аллели SERPINA1 дикого типа (например, у MZ-гетерозиготного индивида). В некоторых вариантах осуществления нокаут представляет собой полную потерю экспрессии эндогенного белка ААТ в клетке.

В контексте данного документа термин «полипептид» относится к белку дикого типа или вариантному белку (например, мутанту, фрагменту, слиянию или их комбинациям). Вариантный полипептид может обладать по меньшей мере или около 5%, 10%, 15%, 20%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 100% функциональной активности полипептида дикого типа. В некоторых вариантах осуществления вариант является по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичным последовательности полипептида дикого типа. В некоторых вариантах осуществления вариантный полипептид может представлять собой гиперактивный вариант. В определенных случаях вариант обладает от около 80% до около 120%, 140%, 160%, 180%, 200% функциональной активности полипептида дикого типа.

В контексте данного документа «двунаправленная конструкция нуклеиновой кислоты» (взаимозаменяемо называемая в данном документе «двунаправленной конструкцией») содержит по меньшей мере два сегмента нуклеиновой кислоты, причем один сегмент (первый сегмент) содержит кодирующую последовательность, которая кодирует представляющий интерес полипептид (кодирующая последовательность может называться в данном документе «трансгеном» или первым трансгеном), тогда как другой сегмент (второй сегмент) содержит последовательность, в которой комплементарная последовательность кодирует представляющий интерес полипептид, или второй трансген. Это означает, что по меньшей мере два сегмента могут кодировать идентичные или разные полипептиды. Когда два сегмента кодируют идентичный полипептид, кодирующая последовательность первого сегмента не обязательно должна быть идентична комплементарной последовательности второго сегмента. В некоторых вариантах осуществления последовательность второго сегмента является обратной комплементарной последовательностью кодирующей последовательности первого сегмента. Двунаправленная конструкция может быть одноцепочечной или двухцепочечной. Описанная в данном документе двунаправленная конструкция включает конструкцию, которая способна экспрессировать любой представляющий интерес полипептид.

В контексте данного документа термин «обратная комплементарная последовательность» относится к последовательности, которая является комплементарной последовательностью референсной последовательности, при этом комплементарная последовательность записана в обратной ориентации. Например, для гипотетическое последовательности 5' CTGGACCGA 3' (SEQ ID NO: 500) «идеальной» комплементарной последовательностью является 3' GACCTGGCT 5' (SEQ ID NO: 501), а «идеальная» обратная комплементарная последовательность записывается 5' TCGGTCCAG 3' (SEQ ID NO: 502). Обратная комплементарная последовательность не обязательно должна быть «идеальной» и при этом может кодировать тот же полипептид или сходный полипептид, что и референсная последовательность. Вследствие избыточной частоты использования кодонов обратная комплементарная последовательность может отличаться от референсной последовательности, кодирующей тот же полипептид. В контексте данного

документа термин «обратная комплементарная последовательность» также включает последовательности, которые являются, например, на 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичными обратной комплементарной последовательности референсной последовательности.

В некоторых вариантах осуществления двунаправленная конструкция нуклеиновой кислоты содержит первый сегмент, который содержит кодирующую последовательность, кодирующую первый полипептид (первый трансген), и второй сегмент, который содержит последовательность, в которой комплементарная последовательность кодирует второй полипептид (второй трансген). В некоторых вариантах осуществления первый и второй полипептиды являются по меньшей мере на 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичными. В некоторых вариантах осуществления первый и второй полипептиды содержат аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной, например, по 50, 100, 200, 500, 1000 или более аминокислотным остаткам.

«Безопасный приемный» локус представляет собой локус в геноме, в который ген может быть вставлен без существенного вредного воздействия на клетку-хозяина, например, гепатоцит, например, не обуславливая апоптоз, некроз и/или старение, или не обуславливая более 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30% или 40% апоптоза, некроза и/или старения, по сравнению с контрольной клеткой. Смотрите, например, Hsin et al., “Hepatocyte death in liver inflammation, fibrosis, and tumorigenesis,” 2017. В некоторых вариантах осуществления безопасный приемный локус обеспечивает сверхэкспрессию экзогенного гена без существенного вредного воздействия на клетку-хозяина, например, гепатоцит, например, не обуславливая апоптоз, некроз и/или старение, или не обуславливая более 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30% или 40% апоптоза, некроза и/или старения, по сравнению с контрольной клеткой. В некоторых вариантах осуществления необходимый безопасный приемный локус может представлять собой локус, в котором экспрессия вставленной генной последовательности не нарушается сквозной экспрессией из соседних генов. Безопасный приемный локус может находиться в гене альбумина, таком как ген альбумина человека. Безопасный приемный локус может находиться в области интрона 1 альбумина, например, интрона 1 альбумина человека. Безопасный приемный локус может представлять собой безопасный приемный локус человека, например, в случае ткани печени или клетки-хозяина гепатоцита. В некоторых вариантах осуществления безопасный приемный локус обеспечивает сверхэкспрессию экзогенного гена без существенного вредного воздействия на клетку-хозяина или популяцию клеток, таких как гепатоциты или клетки печени, например, не обуславливая апоптоз, некроз и/или старение, или не обуславливая более 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30% или 40% апоптоза, некроза и/или старения, по сравнению с контрольной клеткой.

В некоторых вариантах осуществления ген может быть вставлен в безопасный

приемный локус и использовать эндогенную сигнальную последовательность безопасного приемного локуса, например, сигнальную последовательность альбумина, кодируемую экзоном 1. Например, кодирующая ААТ последовательность может быть вставлена в интрон 1 альбумина человека так, чтобы она была расположена ниже и слита с сигнальной последовательностью экзона 1 альбумина человека.

В некоторых вариантах осуществления ген может содержать свою собственную сигнальную последовательность, может быть вставлен в безопасный приемный локус и может дополнительно использовать эндогенную сигнальную последовательность безопасного приемного локуса. Например, кодирующая ААТ последовательность, содержащая сигнальную последовательность ААТ, может быть вставлена в интрон 1 альбумина человека так, чтобы она была расположена ниже и слита с сигнальной последовательностью альбумина человека, кодируемой экзоном 1.

В некоторых вариантах осуществления ген может содержать свою собственную сигнальную последовательность и сайт внутренней посадки рибосомы (IRES), может быть вставлен в безопасный приемный локус и может дополнительно использовать эндогенную сигнальную последовательность безопасного приемного локуса. Например, кодирующая ААТ последовательность, содержащая сигнальную последовательность ААТ и последовательность IRES, может быть вставлена в интрон 1 альбумина человека так, чтобы она была расположена ниже и слита с сигнальной последовательностью альбумина человека, кодируемой экзоном 1.

В некоторых вариантах осуществления ген может содержать свою собственную сигнальную последовательность и IRES, может быть вставлен в безопасный приемный локус и не использовать эндогенную сигнальную последовательность безопасного приемного локуса. Например, кодирующая ААТ последовательность, содержащая сигнальную последовательность ААТ и последовательность IRES, может быть вставлена в интрон 1 альбумина человека так, чтобы она не была слита с сигнальной последовательностью альбумина человека, кодируемой экзоном 1. В этих вариантах осуществления белок транслируется из сайта IRES и не является химерным (например, сигнальный пептид альбумина, слитый с белком ААТ), преимущество чего может состоять в отсутствующей или низкой иммуногенности. В некоторых вариантах осуществления белок не секретируется и/или не транспортируется внеклеточно.

В некоторых вариантах осуществления ген может быть вставлен в безопасный приемный локус и может содержать IRES и не использовать какую-либо сигнальную последовательность. Например, кодирующая ААТ последовательность, содержащая последовательность IRES и не содержащая сигнальную последовательность ААТ, может быть вставлена в интрон 1 альбумина человека так, чтобы она не была слита с сигнальной последовательностью альбумина человека, кодируемой экзоном 1. В некоторых вариантах осуществления белки транслируются из сайта IRES без необходимости в какой-либо сигнальной последовательности. В некоторых вариантах осуществления белок не транспортируется внеклеточно.

В контексте данного документа, клетка, которая не проходит митотическое клеточное деление, называется «неделяющейся» клеткой. «Неделяющаяся» клетка включает типы клеток, которые никогда или редко проходят митотическое клеточное деление, например, многие типы нейронов. «Неделяющаяся» клетка также включает клетки, которые способны к митотическому клеточному делению, но не проходят его или готовы его пройти, например, как покоящаяся клетка. Клетки печени, например, сохраняют способность делиться (например, при повреждении или резекции), но, как правило, не делятся. При митотическом делении клеток гомологичная рекомбинация представляет собой механизм, посредством которого происходит защита генома и репарация двухцепочечных разрывов. В некоторых вариантах осуществления «неделяющаяся» клетка относится к клетке, в которой гомологичная рекомбинация (ГР) не является основным механизмом, посредством которого происходит репарация двухцепочечных разрывов ДНК в клетке, например, по сравнению с контрольной делящейся клеткой. В некоторых вариантах осуществления «неделяющаяся» клетка относится к клетке, в которой негомологичное соединение концов (НГСК) является основным механизмом, посредством которого происходит репарация двухцепочечных разрывов ДНК в клетке, например, по сравнению с контрольной делящейся клеткой.

Неделяющиеся типы клеток были описаны в литературе, например, в отношении активных механизмов НГСК для репарации двухцепочечных разрывов ДНК. Смотрите, например, Iyama, DNA Repair (Amst.) 2013, 12(8): 620-636. В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин включает, но не ограничивается этим, клетку печени, мышечную клетку или нейрональную клетку. В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин представляет собой гепатоцит, такой как гепатоцит мыши, яванского макака или человека. В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин представляет собой миоцит, такой как миоцит мыши, яванского макака или человека. В некоторых вариантах осуществления в данном документе предложена клетка-хозяин, описанная выше, которая содержит описанную в данном документе двунаправленную конструкцию. В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин экспрессирует трансгенный полипептид, кодируемый описанной в данном документе двунаправленной конструкцией. В некоторых вариантах осуществления в данном документе предложена клетка-хозяин, созданная описанным в данном документе способом. В определенных вариантах осуществления клетка-хозяин создана путем введения или доставки в клетку-хозяина описанной в данном документе двунаправленной конструкции нуклеиновой кислоты и системы редактирования генов, такой как система ZFN, TALEN, или CRISPR/Cas9.

Композиции

Композиции, содержащие гидовые РНК (гРНК) безопасного приемного локуса альбумина и/или гидовые РНК (гРНК) SERPINA1

В данном документе предложены композиции гидовых РНК альбумина, композиции матрицы ААТ и способы, применимые для вставки и экспрессии гетерологичного гена ААТ (например, функционального ААТ или ААТ дикого типа) в

геномном локусе, таком как безопасный приемный ген клетки-хозяина. В частности, как проиллюстрировано в данном документе, нацеливание и вставка гетерологичного гена ААТ в локус альбумина (например, в интрон 1) позволяет использовать эндогенный промотор альбумина для управления устойчивой экспрессией гетерологичного гена ААТ. Настоящее изобретение частично основано на идентификации гидовых РНК альбумина, которые специфически нацелены на сайты в интроне 1 гена альбумина и которые обеспечивают эффективную вставку и экспрессию гетерологичного гена ААТ. Как показано в примерах и дополнительно описано в данном документе, способность идентифицированных гРНК опосредовать высокие уровни редактирования, измеряемые по активности образования инделей, неожиданно не обязательно коррелирует с использованием тех же самых гРНК для опосредования эффективной вставки гетерологичных генов, определяемой, например, по экспрессии трансгена ААТ. Таким образом, определенные гРНК, которые способны обеспечивать высокий уровень редактирования, не обязательно способны опосредовать эффективную вставку, и, наоборот, некоторые гРНК, которые, как было показано, обеспечивают низкий уровень редактирования, могут опосредовать эффективную вставку и экспрессию трансгена.

В некоторых вариантах осуществления в данном документе предложены композиции, пригодные для введения или вставки гетерологичного гена ААТ (например, функционального ААТ или ААТ дикого типа) в локус, такой как локус альбумина (например, интрон 1) клетки-хозяина, например, с использованием описанной в данном документе гидовой РНК с РНК-направляемым ДНК-связывающим агентом (например, Cas-нуклеазой) и конструкцией (например, донорной конструкцией или матрицей), содержащей гетерологичную нуклеиновую кислоту ААТ («трансген ААТ»). В некоторых вариантах осуществления в данном документе предложены композиции, пригодные для экспрессии гетерологичного гена ААТ из локуса альбумина клетки-хозяина, например, с использованием описанной в данном документе гидовой РНК альбумина с РНК-направляемым ДНК-связывающим агентом и конструкцией (например, донорной), содержащей гетерологичную нуклеиновую кислоту ААТ. В некоторых вариантах осуществления в данном документе предложены композиции, пригодные для экспрессии гетерологичного гена ААТ в локусе альбумина клетки-хозяина, например, с использованием описанной в данном документе гидовой РНК альбумина с РНК-направляемым ДНК-связывающим агентом и двунаправленной конструкцией, содержащей гетерологичную нуклеиновую кислоту ААТ. В некоторых вариантах осуществления в данном документе предложены композиции и способы, применимые для индукции разрыва (например, двухцепочечного разрыва (ДЦР) или одноцепочечного разрыва (ОЦР или ника)) в гене альбумина клетки-хозяина, например, с использованием описанной в данном документе гидовой РНК альбумина с РНК-направляемым ДНК-связывающим агентом (например, системой CRISPR/Cas). Композиции можно использовать *in vitro* или *in vivo*, например, для лечения ААТД.

В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе гидовые

РНК альбумина содержат направляющую последовательность, которая связывается или способна связываться с интроном локуса альбумина. В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе гидовые РНК альбумина связываются в области интрона 1 гена альбумина человека с SEQ ID NO: 1. Следует понимать, что не каждое основание гидовой последовательности альбумина должно связываться в указанных областях. Например, в некоторых вариантах осуществления 15, 16, 17, 18, 19, 20 или более оснований последовательности гидовой РНК альбумина связываются с указанными областями. Например, в некоторых вариантах осуществления 15, 16, 17, 18, 19, 20 или более смежных оснований последовательности гидовой РНК связываются с указанными областями.

В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе гидовые РНК альбумина опосредуют целенаправленное разрезание РНК-направляемым ДНК-связывающим агентом (например, Cas-нуклеазой) в сайте внутри интрона 1 альбумина человека (SEQ ID NO: 1). Следует понимать, что в некоторых вариантах осуществления гидовые РНК содержат направляющие последовательности, которые связываются с указанными областями или способны связываться с ними.

В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе гидовые РНК альбумина содержат направляющую последовательность, которая по меньшей мере на 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91%, 90%, 89% или 88% идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2-33.

В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе гидовые РНК альбумина содержат направляющую последовательность, содержащую по меньшей мере 15, 16, 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2-33.

В некоторых вариантах осуществления гидовая РНК (гРНК) альбумина содержит направляющую последовательность, выбранную из а) последовательности, которая по меньшей мере на 95%, 90%, 85%, 80% или 75% идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 8, 13, 19, 28, 29, 31, 32, 33; б) по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 8, 13, 19, 28, 29, 31, 32, 33; в) последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 34, 40, 45, 51, 60, 61, 63, 64, 65, 66, 72, 77, 83, 92, 93, 95, 96 и 97; д) последовательности, которая по меньшей мере на 95%, 90%, 85%, 80% или 75% идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2-33; е) по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2-33; ф) последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 34-97; и г) последовательности, комплементарной 15 последовательным нуклеотидам +/- 10 нуклеотидам геномных координат, приведенных для SEQ ID NO: 2-33. В некоторых вариантах осуществления гидовая РНК альбумина содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 8, 13, 19, 28, 29, 31, 32, 33. Смотрите

таблицу 1.

Таблица 1: Нацеленные на альбумин последовательности гидовой РНК человека и хромосомные координаты

ID направляющей	Направляющая последовательность	Геномные координаты	SEQ ID NO:
G009844	GAGCAACCUCACUCUUGUCU	xp4:73405113-73405133	2
G009851	AUGCAUUUGUUUCAAAAUAU	xp4:73405000-73405020	3
G009852	UGCAUUUGUUUCAAAAUAUU	xp4:73404999-73405019	4
G009857	AUUUAUGAGAUCAACAGCAC	xp4:73404761-73404781	5
G009858	GAUCAACAGCACAGGUUUUG	xp4:73404753-73404773	6
G009859	UUAAAUAAGCAUAGUGCAA	xp4:73404727-73404747	7
G009860	UAAAGCAUAGUGCAAUGGAU	xp4:73404722-73404742	8
G009861	UAGUGCAAUGGAUAGGUCUU	xp4:73404715-73404735	9
G009866	UACUAAAACUUUAUUUUACU	xp4:73404452-73404472	10
G009867	AAAGUUGAACAAUAGAAAAA	xp4:73404418-73404438	11
G009868	AAUGCAUAAUCUAAGUCAAA	xp4:73405013-73405033	12
G009874	UAAUAAAAUUCAACAUCU	xp4:73404561-73404581	13
G012747	GCAUCUUUAAAGAAUUUUU	xp4:73404478-73404498	14
G012748	UUUGGCAUUUAUUUCUAAAA	xp4:73404496-73404516	15
G012749	UGUAUUUGUGAAGUCUACA	xp4:73404529-73404549	16
G012750	UCCUAGGUAAAAAAAAAAAA	xp4:73404577-73404597	17
G012751	UAAUUUUCUUUUGCGCACUA	xp4:73404620-73404640	18
G012752	UGACUGAAACUUCACAGAAU	xp4:73404664-73404684	19
G012753	GACUGAAACUUCACAGAAUA	xp4:73404665-73404685	20
G012754	UUCAUUUUAGUCUGUCUUCU	xp4:73404803-73404823	21
G012755	AUUAUCUAAGUUUGAAUAUA	xp4:73404859-73404879	22
G012756	AAUUUUUAAAAUAGUAUUCU	xp4:73404897-73404917	23
G012757	UGAAUUAUUCUUCUGUUUAA	xp4:73404924-73404944	24
G012758	AUCAUCCUGAGUUUUUCUGU	xp4:73404965-73404985	25
G012759	UUACUAAAACUUUAUUUUAC	xp4:73404453-73404473	26
G012760	ACCUUUUUUUUUUUUUUACCU	xp4:73404581-73404601	27
G012761	AGUGCAAUGGAUAGGUCUUU	xp4:73404714-73404734	28
G012762	UGAUUCCUACAGAAAAACUC	xp4:73404973-73404993	29

G012763	UGGGCAAGGGAAGAAAAAAA	xp4:73405094-73405114	30
G012764	CCUCACUCUUGUCUGGGCAA	xp4:73405107-73405127	31
G012765	ACCUCACUCUUGUCUGGGCA	xp4:73405108-73405128	32
G012766	UGAGCAACCUCACUCUUGUC	xp4:73405114-73405134	33

Описанные в данном документе гидовые РНК альбумина опосредуют целенаправленное разрезание, приводящее к двухцепочечному разрыву (ДЦР). Описанные в данном документе гидовые РНК альбумина опосредуют целенаправленное разрезание, приводящее к одноцепочечному разрыву (ОЦР или нику).

В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе гидовые РНК альбумина связываются с областью, расположенной выше мотива, примыкающего к пропоспейсеру (PAM, англ. «propospacer adjacent motif»). Как будет понятно специалистам в данной области техники, последовательность PAM находится в цепи, противоположной цепи, которая содержит целевую последовательность. Это означает, что последовательность PAM находится в цепи, комплементарной целевой цепи (цепи, которая содержит целевую последовательность, с которой связывается гидовая РНК). В некоторых вариантах осуществления PAM выбран из группы, состоящей из NGG, NNGRRT, NNGRR(N), NNAGAAW, NNNNG(A/C)TT и NNNNRYAC. В некоторых вариантах осуществления PAM представляет собой NGG.

В некоторых вариантах осуществления предложенные в данном документе последовательности гидовой РНК комплементарны последовательности, смежной с последовательностью PAM.

В некоторых вариантах осуществления последовательность гидовой РНК содержит последовательность, комплементарную последовательности в геномной области, выбранной из таблиц в данном документе, в соответствии с координатами в референсном геноме человека hg38. В некоторых вариантах осуществления последовательность гидовой РНК содержит последовательность, комплементарную последовательности, которая содержит 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25 последовательных нуклеотидов из геномной области, выбранной из таблиц в данном документе. В некоторых вариантах осуществления последовательность гидовой РНК содержит последовательность, комплементарную последовательности, которая содержит 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25 последовательных нуклеотидов, занимающих геномную область, выбранную из таблиц в данном документе.

Описанные в данном документе гидовые РНК опосредуют целенаправленное разрезание, приводящее к двухцепочечному разрыву (ДЦР). Описанные в данном документе гидовые РНК опосредуют целенаправленное разрезание, приводящее к одноцепочечному разрыву (ОЦР или нику).

В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе гидовые РНК альбумина опосредуют целенаправленное разрезание РНК-направляемым ДНК-связывающим агентом (например, Cas-нуклеазой, описанной в данном документе), при

этом получаемый в результате разрез позволяет проводить вставку гетерологичной нуклеиновой кислоты ААТ (например, функционального ААТ или ААТ дикого типа) в интрон 1 гена альбумина. В некоторых вариантах осуществления гидовая РНК и/или сайт разреза обеспечивает возможность вставки гетерологичного гена ААТ от 1 до 5%, от 5 до 10%, от 15 до 20%, от 20 до 25%, от 25 до 30%, от 30 до 35%, от 35 до 40%, от 40 до 45%, от 45 до 50%, от 50 до 55%, от 55 до 60%, от 60 до 65%, от 65 до 70%, от 70 до 75%, от 75 до 80%, от 80 до 85%, от 85 до 90%, от 90 до 95% или от 95 до 99%. В некоторых вариантах осуществления гидовая РНК и/или сайт разреза обеспечивает возможность вставки нуклеиновой кислоты гетерологичного ААТ по меньшей мере 1%, по меньшей мере 5%, по меньшей мере 10%, по меньшей мере 15%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%. Частоту вставки можно определить *in vitro* или *in vivo*. Например, в некоторых вариантах осуществления частоту вставки можно определить путем обнаружения и измерения вставленной нуклеиновой кислоты гетерологичного ААТ в популяции клеток и расчета процентной доли популяции, которая содержит вставленную нуклеиновую кислоту гетерологичного ААТ. Методы определения уровня вставки известны и доступны в данной области техники. Такие методы включают, например, секвенирование сайта вставки или секвенирование мРНК, выделенной из представляющей интерес ткани или популяции.

В некоторых вариантах осуществления гидовая РНК обеспечивает повышение экспрессии и/или секреции гетерологичного гена ААТ на значение между 5 и 10%, 10 и 15%, 15 и 20%, 20 и 25%, 25 и 30%, 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%, 95 и 99% или более. Например, в некоторых вариантах осуществления повышение экспрессии и/или секреции можно определить путем обнаружения и измерения уровня гетерологичного полипептида ААТ и сравнения этого уровня с уровнем полипептида ААТ до, например, обработки клеток или введения субъекту. Повышение экспрессии и/или секреции гетерологичного гена ААТ можно измерить *in vitro* или *in vivo*. В некоторых вариантах осуществления секрецию и/или экспрессию ААТ измеряют путем обнаружения белка, секретлируемого тканью или популяцией клеток (например, в сыворотке или клеточной среде), или путем обнаружения общего клеточного количества белка из представляющей интерес ткани или популяции клеток, используя, например, ферментный иммуносорбентный анализ (ELISA), ВЭЖХ, масс-спектрометрию (например, жидкостную масс-спектрометрию (например, ЖХ-МС, ЖХ-МС/МС) или вестерн-блот-анализ с культуральной средой и/или клеточным или тканевым (например, печеночным) экстрактом. В некоторых вариантах осуществления секрецию и/или экспрессию ААТ измеряют в первичных гепатоцитах человека, например, образцах среды или клеток. В некоторых вариантах осуществления секрецию ААТ измеряют в клетках HUH7, например, в образцах среды. В некоторых вариантах осуществления используемая клетка представляет собой клетку HUH7. В некоторых вариантах осуществления количество

ААТ сравнивают с количеством глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы GAPDH (ген домашнего хозяйства) для контроля изменений числа клеток. В некоторых вариантах осуществления ААТ можно оценивать путем окрашивания PASD срезов ткани печени, например, для измерения агрегации. В некоторых вариантах осуществления ААТ можно оценивать путем определения ингибирования эластазы нейтрофилов, например, в легких.

В некоторых вариантах осуществления гидовая РНК обеспечивает повышение активности в результате экспрессии гетерологичного гена фактора ААТ (например, функционального ААТ или ААТ дикого типа) на значение между 5 и 10%, 10 и 15%, 15 и 20%, 20 и 25%, 25 и 30%, 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%, 95 и 99% или более. Например, повышение активности можно определить путем обнаружения и измерения уровня активности ингибитора протеазы и сравнения этого уровня с уровнем активности до, например, обработки клеток или введения субъекту. Такие методы доступны и известны в данной области техники. Смотрите, например, Mullins et al., "Standardized automated assay for functional alpha 1-antitrypsin," 1984; Eckfeldt et al., "Automated assay for alpha-1-antitrypsin with N-a-benzoyl-DL-arginine-p-nitroanilide astrypsin substrate and standardized with p-nitrophenyl-p'-guanidinobenzoate as trypsin active sites," 1982.

В некоторых вариантах осуществления целевая последовательность или область в интроне 1 локуса альбумина человека (SEQ ID NO: 1) может быть комплементарной с направляющей последовательностью гидовой РНК альбумина. В некоторых вариантах осуществления степень комплементарности или идентичности между направляющей последовательностью гидовой РНК и соответствующей ей целевой последовательностью может составлять по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%. В некоторых вариантах осуществления целевая последовательность и направляющая последовательность гРНК могут быть на 100% комплементарными или идентичными. В других вариантах осуществления целевая последовательность и направляющая последовательность гРНК могут содержать по меньшей мере одно несовпадение. Например, целевая последовательность и направляющая последовательность гРНК могут содержать 1, 2, 3 или 4 несовпадений, при этом общая длина гидовой последовательности составляет около 20 или 20. В некоторых вариантах осуществления целевая последовательность и направляющая последовательность гРНК могут содержать 1-4 несовпадения, при этом длина гидовой последовательности составляет около 20 или 20 нуклеотидов.

Как описано и проиллюстрировано в данном документе, гидовые РНК альбумина можно использовать для вставки и экспрессии гетерологичного гена ААТ (например, функционального ААТ или ААТ дикого типа) в интроне 1 гена альбумина в комбинации с гидовой РНК SERPINA1 для нокдауна или нокаута эндогенного гена SERPINA1 (например, мутантного гена SERPINA1). Таким образом, в некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение включает композиции, содержащие одну или более гидовых РНК (гРНК) SERPINA1, содержащих направляющие последовательности,

которые направляют РНК-направляемый ДНК-связывающий агент (например, Cas9) к целевой последовательности ДНК в SERPINA1. гРНК может содержать одну или более направляющих последовательностей, приведенных в таблице 2. В некоторых вариантах осуществления предложены одна или более гидовых РНК SERPINA1, содержащих направляющую последовательность любой из SEQ ID NO: 1000-1128.

В одном аспекте в изобретении предложена гРНК SERPINA1, которая содержит направляющую последовательность, которая по меньшей мере на 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91%, 90%, 89% или 88% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 1000-1128.

В других вариантах осуществления композиция содержит по меньшей мере две гРНК SERPINA1, содержащие направляющие последовательности, выбранные из любых двух или более направляющих последовательностей SEQ ID NO: 1000-1128. В некоторых вариантах осуществления композиция содержит по меньшей мере две гРНК, каждая из которых по меньшей мере на 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91%, 90%, 89% или 88% идентична любой из нуклеиновых кислот SEQ ID NO: 1000-1128.

Композиции гидовой РНК SERPINA1 по настоящему изобретению предназначены для распознавания целевой последовательности в гене SERPINA1. Например, распознавание и расщепление целевой последовательности SERPINA1 может осуществлять РНК-направляемый ДНК-связывающий агент. В некоторых вариантах осуществления белок Cas может направляться гидовой РНК SERPINA1 к целевой последовательности гена SERPINA1, где направляющая последовательность гидовой РНК гибридизируется с целевой последовательностью, а белок Cas расщепляет целевую последовательность.

В некоторых вариантах осуществления выбор одной или более гидовых РНК SERPINA1 определяют на основании целевых последовательностей в гене SERPINA1.

Не ограничиваясь какой-либо конкретной теорией, считается, что мутации в критических областях гена могут быть хуже переносимыми, чем мутации в не критических областях гена, таким образом, место ДЦР является важным фактором для степени или типа нокдауна или нокаута белка, которые можно получить в результате. В некоторых вариантах осуществления гРНК SERPINA1, комплементарную или имеющую комплементарность с целевой последовательностью в SERPINA1, используют для направления белка Cas к конкретному месту в гене SERPINA1. В некоторых вариантах осуществления гРНК SERPINA1 сконструированы так, чтобы иметь направляющие последовательности, комплементарные или имеющие комплементарность с целевыми последовательностями в экзонах 2, 3, 4 или 5 SERPINA1.

В некоторых вариантах осуществления гРНК SERPINA1 сконструированы так, чтобы быть комплементарными или иметь комплементарность с целевыми последовательностями в экзонах SERPINA1, которые кодируют N-концевую область ААТ.

Таблица 2: Номенклатура нацеленных на SERPINA1 и контрольных направляющих последовательностей, хромосомные координаты и

последовательность

SEQ ID NO	ID направляющей	Описание	Хромосомные координаты человека (hg38)	Направляющие последовательности
1000	CR001261	Контроль 1	Xp1:55039269-55039291	GCCAGACUCCAAGUUC UGCC
1001	CR001262	Контроль 2	Xp1:55039155-55039177	UAAGGCCAGUGGAAAG AAUU
1002	CR001263	Контроль 3	Xp1:55039180-55039202	GGCAGCGAGGAGUCCA CAGU
1003	CR001264	Контроль 4	Xp1:55039149-55039171	UCUUUCCACUGGCCUU AACC
1004	CR001367	Экзон 2	Xp14:94383211-94383233	CAAUGCCGUCUUCUGU CUCG
1005	CR001368	Экзон 2	Xp14:94383210-94383232	AAUGCCGUCUUCUGUC UCGU
1006	CR001369	Экзон 2	Xp14:94383209-94383231	AUGCCGUCUUCUGUCU CGUG
1007	CR001370	Экзон 2	Xp14:94383206-94383228	AUGCCCCACGAGACAG AAGA
1008	CR001371	Экзон 2	Xp14:94383195-94383217	CUCGUGGGGCAUCCUC CUGC
1009	CR001372	Экзон 2	Xp14:94383152-94383174	GGAUCCUCAGCCAGGG AGAC
1010	CR001373	Экзон 2	Xp14:94383146-94383168	UCCUGGCUGAGGAUC CCCA
1011	CR001374	Экзон 2	Xp14:94383145-94383167	UCCUGGGGAUCCUCA GCCA
1012	CR001375	Экзон 2	Xp14:94383144-94383166	CUCCUGGGGAUCCUC AGCC
1013	CR001376	Экзон 2	Xp14:94383115-94383137	GUGGGAUGUAUCUGUC UUCU

1014	CR001377	Экзон 2	Xp14:94383114 -94383136	GGUGGGAUGUAUCUGU CUUC
1015	CR001378	Экзон 2	Xp14:94383105 -94383127	AGAUACAUCCCACCAU GAUC
1016	CR001379	Экзон 2	Xp14:94383097 -94383119	UGGGUGAUCCUGAUCA UGGU
1017	CR001380	Экзон 2	Xp14:94383096 -94383118	UUGGGUGAUCCUGAUC AUGG
1018	CR001381	Экзон 2	Xp14:94383093 -94383115	AGGUUGGGUGAUCCUG AUCA
1019	CR001382	Экзон 2	Xp14:94383078 -94383100	GGGUGAUCUUGUUGAA GGUU
1020	CR001383	Экзон 2	Xp14:94383077 -94383099	GGGGUGAUCUUGUUGA AGGU
1021	CR001384	Экзон 2	Xp14:94383069 -94383091	CAACAAGAUCACCCCC AACC
1022	CR001385	Экзон 2	Xp14:94383057 -94383079	AGGCGAACUCAGCCAG GUUG
1023	CR001386	Экзон 2	Xp14:94383055 -94383077	GAAGGCGAACUCAGCC AGGU
1024	CR001387	Экзон 2	Xp14:94383051 -94383073	GGCUGAAGGCGAACUC AGCC
1025	CR001388	Экзон 2	Xp14:94383037 -94383059	CAGCUGGCGGUAUAGG CUGA
1026	CR001389	Экзон 2	Xp14:94383036 -94383058	CUUCAGCCUAUACCGC CAGC
1027	CR001390	Экзон 2	Xp14:94383030 -94383052	GGUGUGCCAGCUGGCG GUAU
1028	CR001391	Экзон 2	Xp14:94383021 -94383043	UGUUGGACUGGUGUGC CAGC
1029	CR001392	Экзон 2	Xp14:94383009 -94383031	AGAUAUUGGUGCUGUU GGAC

1030	CR001393	Экзон 2	Xp14:94383004 -94383026	GAAGAAGAUUUGGU GCUGU
1031	CR001394	Экзон 2	Xp14:94382995 -94383017	CACUGGGGAGAAGAAG AUAU
1032	CR001395	Экзон 2	Xp14:94382980 -94383002	GGCUGUAGCGAUGCUC ACUG
1033	CR001396	Экзон 2	Xp14:94382979 -94383001	AGGCUGUAGCGAUGC CACU
1034	CR001397	Экзон 2	Xp14:94382978 -94383000	AAGGCUGUAGCGAUGC UCAC
1035	CR001398	Экзон 2	Xp14:94382928 -94382950	UGACACUCACGAUGAA AUCC
1036	CR001399	Экзон 2	Xp14:94382925 -94382947	CACUCACGAUGAAAUC CUGG
1037	CR001400	Экзон 2	Xp14:94382924 -94382946	ACUCACGAUGAAAUCC UGGA
1038	CR001401	Экзон 2	Xp14:94382910 -94382932	GGUUGAAAUUCAGGCC CUCC
1039	CR001402	Экзон 2	Xp14:94382904 -94382926	GGGCCUGAAUUUCAAC CUCA
1040	CR001403	Экзон 2	Xp14:94382895 -94382917	UUUCAACCUCACGGAG AUUC
1041	CR001404	Экзон 2	Xp14:94382892 -94382914	CAACCUCACGGAGAUU CCGG
1042	CR001405	Экзон 2	Xp14:94382889 -94382911	GAGCCUCCGGAAUCUC CGUG
1043	CR001406	Экзон 2	Xp14:94382876 -94382898	CCGGAGGCUCAGAUC AUGA
1044	CR001407	Экзон 2	Xp14:94382850 -94382872	UGAGGGUACGGAGGAG UUC
1045	CR001408	Экзон 2	Xp14:94382841 -94382863	CUGGCUGGUUGAGGGU ACGG

1046	CR001409	Экзон 2	Xp14:94382833 -94382855	CUGGCUGUCUGGCUGG UUGA
1047	CR001410	Экзон 2	Xp14:94382810 -94382832	CUCCAGCUGACCACCG GCAA
1048	CR001411	Экзон 2	Xp14:94382808 -94382830	GGCCAUUGCCGGUGGU CAGC
1049	CR001412	Экзон 2	Xp14:94382800 -94382822	GAGGAACAGGCCAUUG CCGG
1050	CR001413	Экзон 2	Xp14:94382797 -94382819	GCUGAGGAACAGGCCA UUGC
1051	CR001414	Экзон 2	Xp14:94382793 -94382815	CAAUGGCCUGUCCUC AGCG
1052	CR001415	Экзон 2	Xp14:94382792 -94382814	AAUGGCCUGUCCUCA GCGA
1053	CR001416	Экзон 2	Xp14:94382787 -94382809	UCAGGCCUCGCUGAG GAAC
1054	CR001417	Экзон 2	Xp14:94382781 -94382803	CUAGCUUCAGGCCUC GCUG
1055	CR001418	Экзон 2	Xp14:94382778 -94382800	CAGCGAGGGCCUGAAG CUAG
1056	CR001419	Экзон 2	Xp14:94382769 -94382791	AAAACUUAUCCACUAG CUUC
1057	CR001420	Экзон 2	Xp14:94382766 -94382788	GAAGCUAGUGGAUAAG UUUU
1058	CR001421	Экзон 2	Xp14:94382763 -94382785	GCUAGUGGAUAAGUUU UUGG
1059	CR001422	Экзон 2	Xp14:94382724 -94382746	UGACAGUGAAGGCUUC UGAG
1060	CR001423	Экзон 2	Xp14:94382716 -94382738	AAGCCUUCACUGUCA CUUC
1061	CR001424	Экзон 2	Xp14:94382715 -94382737	AGCCUUCACUGUCAAC UUCG

1062	CR001425	Экзон 2	Xp14:94382713 -94382735	GUCCCCGAAGUUGACA GUGA
1063	CR001426	Экзон 2	Xp14:94382703 -94382725	CAACUUCGGGGACACC GAAG
1064	CR001427	Экзон 2	Xp14:94382689 -94382711	GAUCUGUUUCUUGGCC UCUU
1065	CR001428	Экзон 2	Xp14:94382680 -94382702	GUAAUCGUUGAUCUGU UUCU
1066	CR001429	Экзон 2	Xp14:94382676 -94382698	GAAACAGAUCAACGAU UACG
1067	CR001430	Экзон 2	Xp14:94382670 -94382692	GAUCAACGAUUACGUG GAGA
1068	CR001431	Экзон 2	Xp14:94382669 -94382691	AUCAACGAUUACGUGG AGAA
1069	CR001432	Экзон 2	Xp14:94382660 -94382682	UACGUGGAGAAGGGUA CUCA
1070	CR001433	Экзон 2	Xp14:94382659 -94382681	ACGUGGAGAAGGGUAC UCAA
1071	CR001434	Экзон 2	Xp14:94382643 -94382665	UCAAGGGAAAAUUGUG GAUU
1072	CR001435	Экзон 2	Xp14:94382637 -94382659	GAAAAUUGUGGAUUU GGUCA
1073	CR001436	Экзон 2	Xp14:94382607 -94382629	CAGAGACACAGUUUUU GCUC
1074	CR001437	Экзон 3	Xp14:94381127 -94381149	UCCCCUCUCUCCAGGC AAAU
1075	CR001438	Экзон 3	Xp14:94381098 -94381120	CUCGGUGUCCUUGACU UCAA
1076	CR001439	Экзон 3	Xp14:94381097 -94381119	CUUUGAAGUCAAGGAC ACCG
1077	CR001440	Экзон 3	Xp14:94381080 -94381102	CACGUGGAAGUCCUCU UCCU

1078	CR001441	Экзон 3	Xp14:94381079 -94381101	CGAGGAAGAGGACUUC CACG
1079	CR001442	Экзон 3	Xp14:94381073 -94381095	AGAGGACUUCCACGUG GACC
1080	CR001443	Экзон 3	Xp14:94381064 -94381086	CGGUGGUCACCUGGUC CACG
1081	CR001444	Экзон 3	Xp14:94381058 -94381080	GGACCAGGUGACCACC GUGA
1082	CR001445	Экзон 3	Xp14:94381055 -94381077	GCACCUUCACGGUGGU CACC
1083	CR001446	Экзон 3	Xp14:94381047 -94381069	CAUCAUAGGCACCUUC ACGG
1084	CR001447	Экзон 3	Xp14:94381036 -94381058	GUGCCUAUGAUGAAGC GUUU
1085	CR001448	Экзон 3	Xp14:94381033 -94381055	AUGCCUAAACGCUUCA UCAU
1086	CR001449	Экзон 3	Xp14:94381001 -94381023	UGGACAGCUUCUACA GUGC
1087	CR001450	Экзон 3	Xp14:94380995 -94381017	CUGUAAGAAGCUGUCC AGCU
1088	CR001451	Экзон 3	Xp14:94380974 -94380996	GGUGCUGCUGAUGAAA UACC
1089	CR001452	Экзон 3	Xp14:94380973 -94380995	GUGCUGCUGAUGAAAU ACCU
1090	CR001453	Экзон 3	Xp14:94380956 -94380978	AGAUGGCGGUGGCAUU GCCC
1091	CR001454	Экзон 3	Xp14:94380945 -94380967	AGGCAGGAAGAAGAUG GCGG
1092	CR001474	Экзон 5	Xp14:94378611 -94378633	GGUCAGCACAGCCUUA UGCA
1093	CR001475	Экзон 5	Xp14:94378581 -94378603	AGAAAGGGACUGAAGC UGCU

1094	CR001476	Экзон 5	Xp14:94378580 -94378602	GAAAGGGACUGAAGCU GCUG
1095	CR001477	Экзон 5	Xp14:94378565 -94378587	UGCUGGGGCAUGUUU UUAG
1096	CR001478	Экзон 5	Xp14:94378557 -94378579	GGGUAUGGCCUCUAAA AACA
1097	CR001483	Экзон 5	Xp14:94378526 -94378548	UGUUGAACUUGACCUC GGGG
1098	CR001484	Экзон 5	Xp14:94378521 -94378543	GGGUUUGUUGAACUUG ACCU
1099	CR003190	Экзон 2	Xp14:94383131 -94383153	UUCUGGGCAGCAUCUC CCUG
1100	CR003191	Экзон 2	Xp14:94383129 -94383151	UCUUCUGGGCAGCAUC UCCC
1101	CR003196	Экзон 2	Xp14:94383024 -94383046	UGGACUGGUGUGCCAG CUGG
1102	CR003204	Экзон 2	Xp14:94382961 -94382983	AGCCUUUGCAAUGCUC UCCC
1103	CR003205	Экзон 2	Xp14:94382935 -94382957	UUCAUCGUGAGUGUCA GCCU
1104	CR003206	Экзон 2	Xp14:94382901 -94382923	UCUCCGUGAGGUUGAA AUUC
1105	CR003207	Экзон 2	Xp14:94382822 -94382844	GUCAGCUGGAGCUGGC UGUC
1106	CR003208	Экзон 2	Xp14:94382816 -94382838	AGCCAGCUCCAGCUGA CCAC
1107	CR003217	Экзон 3	Xp14:94380942 -94380964	AUCAGGCAGGAAGAAG AUGG
1108	CR003218	Экзон 3	Xp14:94380938 -94380960	CAUCUUCUCCUGCCU GAUG
1109	CR003219	Экзон 3	Xp14:94380937 -94380959	AUCUUCUCCUGCCUG AUGA

1110	CR003220	Экзон 3	Xp14:94380881 -94380903	CGAUAUCAUCAACCAAG UUCC
1111	CR003221	Экзон 4	Xp14:94379554 -94379576	CAGAUCAUAGGUUCCA GUAA
1112	CR003222	Экзон 4	Xp14:94379507 -94379529	AUCACUAAGGUCUUCA GCAA
1113	CR003223	Экзон 4	Xp14:94379506 -94379528	UCACUAAGGUCUUCAG CAAU
1114	CR003224	Экзон 4	Xp14:94379505 -94379527	CACUAAGGUCUUCAGC AAUG
1115	CR003225	Экзон 4	Xp14:94379453 -94379475	CUCACCUUGGAGAGCU UCAG
1116	CR003226	Экзон 4	Xp14:94379452 -94379474	UCUCACCUUGGAGAGC UUCA
1117	CR003227	Экзон 4	Xp14:94379451 -94379473	AUCUCACCUUGGAGAG CUUC
1118	CR003235	Экзон 5	Xp14:94378525 -94378547	UUGUUGAACUUGACCU CGGG
1119	CR003236	Экзон 5	Xp14:94378524 -94378546	UUUGUUGAACUUGACC UCGG
1120	CR003237	Экзон 5	Xp14:94378523 -94378545	GUUUGUUGAACUUGAC CUCG
1121	CR003238	Экзон 5	Xp14:94378522 -94378544	GGUUUGUUGAACUUGA CCUC
1122	CR003240	Экзон 5	Xp14:94378501 -94378523	UCAAUCAUUAAGAAGA CAAA
1123	CR003241	Экзон 5	Xp14:94378500 -94378522	UCAAUCAUUAAGAAG ACAA
1124	CR003242	Экзон 5	Xp14:94378472 -94378494	UACCAAGUCUCCCCUC UUCA
1125	CR003243	Экзон 5	Xp14:94378471 -94378493	ACCAAGUCUCCCCUCU UCAU

1126	CR003244	Экзон 5	Xp14:94378463 -94378485	UCCCCUCUCAUGGGA AAAG
1127	CR003245	Экзон 5	Xp14:94378461 -94378483	CACCACUUUCCCAUG AAGA
1128	CR003246	Экзон 5	Xp14:94378460 -94378482	UCACCACUUUCCCAU GAAG

Каждая из направляющих последовательностей альбумина и направляющих последовательностей SERPINA1, приведенных в таблице 1 под SEQ ID NO: 2-33 и таблице 2 под SEQ ID NO: 1000-1128, соответственно, может дополнительно содержать дополнительные нуклеотиды с образованием сгРНК и/или гидовой РНК, например, со следующей типовой нуклеотидной последовательностью после направляющей последовательности в 3' конце: GUUUUAGAGCUAUGCUGUUUUG (SEQ ID NO: 900) в ориентации от 5' к 3'. В случае оРНК вышеприведенные направляющие последовательности (направляющие последовательности альбумина и направляющие последовательности SERPINA1, приведенные в таблице 1 под SEQ ID NO: 2-33 и таблице 2 под SEQ ID NO: 1000-1128, соответственно) могут дополнительно содержать дополнительные нуклеотиды с образованием оРНК, например, со следующей типовой нуклеотидной последовательностью, следующей за 3' концом направляющей последовательности:

GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGA
AAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU (SEQ ID NO: 901) в ориентации от 5' к 3'.

Гидовая РНК альбумина и/или SERPINA1 может дополнительно содержать трРНК. В каждом описанном в данном документе варианте осуществления композиции и способа сгРНК и трРНК могут быть связаны в виде одной РНК (оРНК) или могут находиться в отдельных РНК (дгРНК). В контексте оРНК компоненты сгРНК и трРНК могут быть связаны ковалентно, например, посредством фосфодиэфирной связи или другой ковалентной связи. В некоторых вариантах осуществления оРНК содержит одну или более связей между нуклеотидами, которые не являются фосфодиэфирными связями.

В каждом из описанных в данном документе вариантов осуществления композиции, применения и способа гидовая РНК может содержать две молекулы РНК в виде «двойной гидовой РНК» или «дгРНК». дгРНК содержит первую молекулу РНК, содержащую сгРНК, содержащую, например, направляющую последовательность, приведенную в таблице 1 и/или таблице 2, и вторую молекулу РНК, содержащую трРНК. Первая и вторая молекулы РНК могут не быть ковалентно связанными, но могут образовывать двойную спираль РНК посредством спаривания оснований между частями сгРНК и трРНК.

В каждом из описанных в данном документе вариантов осуществления композиции, применения и способа гидовая РНК (гРНК альбумина и/или гРНК SERPINA1) может содержать одну молекулу РНК в виде «одинарной гидовой РНК» или

«огРНК». огРНК может содержать сгРНК (или ее часть), содержащую направляющую последовательность, приведенную в таблице 1 или таблице 2, ковалентно связанную с trРНК. огРНК может содержать 15, 16, 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотида направляющей последовательности, приведенной в таблице 1 или таблице 2. В некоторых вариантах осуществления сгРНК и trРНК ковалентно связаны посредством линкера. В некоторых вариантах осуществления огРНК образует структуру типа «стебель - петля» посредством спаривания оснований между частями сгРНК и trРНК. В некоторых вариантах осуществления сгРНК и trРНК ковалентно связаны посредством одной или более связей, которые не являются фосфодиэфирными связями. В некоторых вариантах осуществления гидовая РНК содержит огРНК, приведенную в любой из SEQ ID NO: 34-67 или 120-163. В некоторых вариантах осуществления гидовая РНК содержит огРНК, содержащую любую из направляющих последовательностей SEQ ID NO: 2-33, 98-119, 165-170, 172, 174-176, 182-185, 189-193, 195-193, 195 или 196 и нуклеотиды из SEQ ID NO: 901, причем нуклеотиды из SEQ ID NO: 901 расположены в 3'-конце направляющей последовательности, а огРНК может быть модифицированной, как показано в таблицах 9, 11 или 13 или SEQ ID NO: 300.

В некоторых вариантах осуществления trРНК может содержать всю или часть последовательности trРНК, полученной из системы CRISPR/Cas природного происхождения. В некоторых вариантах осуществления trРНК содержит усеченную или модифицированную trРНК дикого типа. Длина trРНК зависит от используемой системы CRISPR/Cas. В некоторых вариантах осуществления trРНК содержит или состоит из 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 или более 100 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления trРНК может содержать определенные вторичные структуры, такие как, например, одна или более структур типа шпильки или стебель - петля, или одна или более структур с выпетливанием.

В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе композиция или состав содержат мРНК, содержащую открытую рамку считывания (ОРС), кодирующую РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, такой как Cas-нуклеаза, как описано в данном документе. В некоторых вариантах осуществления предложена, применяется или вводится мРНК, содержащая ОРС, кодирующую РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, такой как Cas-нуклеаза.

С. Модифицированные гРНК и мРНК

В некоторых вариантах осуществления описанная в данном документе гРНК (например, гРНК альбумина или SERPINA1) является химически модифицированной. гРНК, содержащая один или более модифицированных нуклеозидов или нуклеотидов, называется «модифицированной» гРНК или «химически модифицированной» гРНК для описания наличия одного или более неприродных и/или природных компонентов или конфигураций, используемых вместо или в дополнение к каноническим остаткам А, G, С и U. В некоторых вариантах осуществления модифицированную гРНК синтезируют с неканоническим нуклеозидом или нуклеотидом, что в данном документе называется

«модифицированным». Модифицированные нуклеозиды и нуклеотиды могут включать одно или более из: (i) изменения, например, замены одного или обоих несвязывающих фосфатных атомов кислорода и/или одного или более связывающих фосфатных атомов кислорода в связи фосфодиэфирного остова (типовая модификация остова); (ii) изменения, например, замены составляющего компонента сахара рибозы, например 2'-гидроксила в сахаре рибозы (типовая модификация сахара); (iii) полной замены фосфатного фрагмента «дефосфо»-линкерами (типовая модификация остова); (iv) модификации или замены нуклеоснования природного происхождения, в том числе неканоническим нуклеоснованием (типовая модификация основания); (v) замены или модификации рибозо-фосфатного остова (типовая модификация остова); (vi) модификации 3' конца или 5' конца олигонуклеотида, например, удаление, модификацию или замену концевой фосфатной группы или конъюгацию фрагмента, кэпа или линкера (такие модификации 3' или 5' кэпа могут включать модификацию сахара и/или остова); и (vii) модификации или замены сахара (типовая модификация сахара).

Химические модификации, такие как перечисленные выше, можно комбинировать, чтобы получить модифицированные гРНК и/или мРНК, содержащих нуклеозиды и нуклеотиды (вместе «остатки»), которые могут иметь две, три, четыре или более модификаций. Например, модифицированный остаток может содержать модифицированный сахар и модифицированное нуклеоснование. В некоторых вариантах осуществления каждое основание гРНК модифицировано, например, все основания имеют модифицированную фосфатную группу, такую как тиофосфатная группа. В некоторых вариантах осуществления все или практически все фосфатные группы молекулы гРНК заменены тиофосфатными группами. В некоторых вариантах осуществления модифицированные гРНК содержат по меньшей мере один модифицированный остаток в 5' конце РНК или вблизи него. В некоторых вариантах осуществления модифицированные гРНК содержат по меньшей мере один модифицированный остаток в 3' конце РНК или вблизи него.

В некоторых вариантах осуществления гРНК содержит один, два, три или более модифицированных остатков. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 5% (например, по меньшей мере 5%, по меньшей мере 10%, по меньшей мере 15%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 25%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 35%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 45%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или 100%) позиций в модифицированной гРНК представлены модифицированными нуклеозидами или нуклеотидами.

Немодифицированные нуклеиновые кислоты могут быть подвержены деградации, например, внутриклеточными нуклеазами или сывороточными нуклеазами. Например, нуклеазы могут гидролизовать фосфодиэфирные связи нуклеиновых кислот. Соответственно, в одном аспекте описанные в данном документе гРНК могут содержать

один или более модифицированных нуклеозидов или нуклеотидов, например, для придания стабильности по отношению к внутриклеточным нуклеазам или сывороточным нуклеазам. В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе модифицированные молекулы гРНК могут демонстрировать сниженный врожденный иммунный ответ при внесении в популяцию клеток как *in vivo*, *in vitro* и *ex vivo*. Термин «врожденный иммунный ответ» включает клеточный ответ на экзогенные нуклеиновые кислоты, включая одноцепочечные нуклеиновые кислоты, который включает индукцию экспрессии и высвобождения цитокинов, в частности интерферонов, и гибель клеток.

В некоторых вариантах осуществления модификации остова фосфатная группа модифицированного остатка может быть модифицирована путем замены одного или более атомов кислорода другим заместителем. Кроме того, модифицированный остаток, например, модифицированный остаток, присутствующий в модифицированной нуклеиновой кислоте, может характеризоваться полной заменой немодифицированного фосфатного фрагмента модифицированной фосфатной группой, как описано в данном документе. В некоторых вариантах осуществления модификация основной цепи фосфатной основной цепи может включать изменения, которые приводят к получению незаряженного линкера или заряженного линкера с несимметричным распределением заряда.

Примеры модифицированных фосфатных групп включают тиофосфат, фосфороселенаты, боранофосфаты, сложные эфиры боранофосфатов, гидрофосфонаты, фосфоамидаты, алкил- или арилфосфонаты и фосфотриэфиры. Атом фосфора в немодифицированной фосфатной группе является ахиральным. Однако замещение одного из мостиковых атомов кислорода одним из вышеперечисленных атомов или групп атомов может сделать атом фосфора хиральным. Стереогенный атом фосфора может обладать «R»-конфигурацией (в данном документе - Rp) или «S»-конфигурацией (в данном документе - Sp). Остов также можно модифицировать путем замены мостикового кислорода (т. е. кислорода, который связывает фосфат с нуклеозидом) на азот (мостиковые фосфорамидаты), серу (мостиковые тиофосфаты) и углерод (мостиковые метиленфосфонаты). Замена может происходить либо в связывающем атоме кислороде, либо в обоих связывающих атомах кислорода.

В определенных модификациях остова фосфатная группа может быть заменена не содержащими фосфор соединителями. В некоторых вариантах осуществления заряженная фосфатная группа может быть заменена нейтральным фрагментом. Примеры фрагментов, которые могут заменять фосфатную группу, могут включать, без ограничения, например, метилфосфонат, гидроксиламино, силосан, карбонат, карбоксиметил, карбамат, амид, тиоэфир, линкер на основе этиленоксида, сульфонат, сульфонамид, тиоформацеталь, формацеталь, оксим, метиленимино, метиленметилено, метиленигидразо, метиленидиметилгидразо и метилениоксиметилено.

Также можно конструировать каркасы, которые могут имитировать нуклеиновые кислоты, в которых фосфатный линкер и сахар рибозы заменены нуклеозидными или

нуклеотидными суррогатами, устойчивыми к нуклеазам. Такие модификации могут включать модификации остова и сахара. В некоторых вариантах осуществления нуклеооснования могут быть плотно связаны посредством суррогатного остова. Примеры могут включать, без ограничения, суррогаты нуклеозидов морфолино, циклобутила, пирролидина и пептидной нуклеиновой кислоты (ПНК).

Модифицированные нуклеозиды и модифицированные нуклеотиды могут содержать одну или более модификаций группы сахара, т. е. модификации сахара. Например, 2'-гидроксильная группа (ОН) может быть модифицирована, например, заменена рядом разных «окси»- или «дезокси»-заместителей. В некоторых вариантах осуществления модификации 2'-гидроксильной группы могут повысить стабильность нуклеиновой кислоты, поскольку гидроксил уже невозможно депротонировать с образованием 2'-алкоксидного иона.

Примеры модификаций 2'-гидроксильных групп могут включать алкокси или арилокси (OR, где «R» может представлять собой, например, алкил, циклоалкил, арил, аралкил, гетероарил или сахар); полиэтиленгликоли (ПЭГ), $O(CH_2CH_2O)_nCH_2CH_2OR$, где R может представлять собой, например, H или необязательно замещенный алкил, а n может представлять собой целое число 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 осуществления модификация 2'-гидроксильной группы может представлять собой 2'-O-Me. В некоторых вариантах осуществления модификация 2'-гидроксильной группы может представлять собой 2'-фтор-модификацию, которая состоит в замене 2'-гидроксильной группы фторидом. В некоторых вариантах осуществления модификация 2'-гидроксильной группы может включать «запертые» нуклеиновые кислоты (ЗНК), в которых 2'-гидроксил может быть соединен, например, посредством C_{1-6} алкиленового или C_{1-6} гетероалкиленового мостика, с 4'-атомом углерода того же рибозного сахара, где типовые мостики могут включать метиленовые, пропиленовые, эфирные или аминные мостики; O-амино (где амино может представлять собой, например, NH_2 ; алкиламино, диалкиламино, гетероциклил, ариламино, диариламино, гетероариламино или дигетероариламино, этилендиамин или полиамино) и аминококси, $O(CH_2)_n$ -амино (где амино может представлять собой, например, NH_2 ; алкиламино, диалкиламино, гетероциклил, ариламино, диариламино, гетероариламино или дигетероариламино, этилендиамин или полиамино). В некоторых вариантах осуществления модификация 2'-гидроксильной группы может включать «открытые» нуклеиновые кислоты (ОНК), в которых в рибозном кольце отсутствует связь C2'-C3'. В некоторых вариантах осуществления модификация 2'-гидроксильной группы может включать метоксиэтильную группу (МОЭ), $(OCH_2CH_2OCH_3)$, например, производное ПЭГ).

«Дезокси»-2'-модификации могут включать водород (т. е. сахара дезоксирибозы, например, в выступающих частях частично дцРНК); галоген (например, бром, хлор, фтор или йод); амино (где амино может представлять собой, например, NH_2 ; алкиламино,

диалкиламино, гетероциклил, ариламино, диариламино, гетероариламино, дигетероариламино или аминокислоту; $\text{NH}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH})_n\text{CH}_2\text{CH}_2$ -амино (где амино может быть, например таким, как описано в данном документе), $-\text{NHC}(\text{O})\text{R}$ (где R может представлять собой, например, алкил, циклоалкил, арил, аралкил, гетероарил или сахар), циано; меркапто; алкилтиоалкил; тиоалкокси; и алкил, циклоалкил, арил, алкенил и алкинил, которые могут быть необязательно замещены, например, амино, как описано в данном документе.

Модификация сахара может включать сахарную группу, которая также может содержать один или более атомов углерода, которые обладают стереохимической конфигурацией, противоположной конфигурации соответствующего атома углерода в рибозе. Таким образом, модифицированная нуклеиновая кислота может содержать нуклеотиды, содержащие, например, арабинозу в качестве сахара. Модифицированные нуклеиновые кислоты могут также содержать абазические сахара. Эти абазические сахара также могут быть дополнительно модифицированы в одном или более составляющих сахар атомах. Модифицированные нуклеиновые кислоты могут также содержать один или более сахаров в L-форме, например, L-нуклеозиды.

Описанные в данном документе модифицированные нуклеозиды и модифицированные нуклеотиды, которые могут быть включены в модифицированную нуклеиновую кислоту, могут содержать модифицированное основание, также называемое нуклеосооснованием. Примеры нуклеосооснований включают, но не ограничиваются этим, аденин (A), гуанин (G), цитозин (C) и урацил (U). Эти нуклеосооснования могут быть модифицированы или полностью заменены для получения модифицированных остатков, которые могут быть включены в модифицированные нуклеиновые кислоты. Нуклеосооснование нуклеотида может быть независимо выбрано из пурина, пиримидина, аналога пурина или аналога пиримидина. В некоторых вариантах осуществления нуклеосооснование может включать, например, встречающиеся в природе и синтетические производные основания.

В вариантах осуществления, в которых используется двойная гидовая РНК, каждая из *cg*РНК и *tracr*-РНК может содержать модификации. Такие модификации могут находиться в одном или обоих концах *cg*РНК и/или *tracr*РНК. В вариантах осуществления, включающих *og*РНК, один или более остатков в одном или обоих концах *og*РНК могут быть химически модифицированы, и/или внутренние нуклеозиды могут быть модифицированы, и/или вся *og*РНК может быть химически модифицирована. Некоторые варианты осуществления включают модификацию 5' конца. Некоторые варианты осуществления включают модификацию 3' конца.

В некоторых вариантах осуществления гидовые РНК, описанные в данном документе, имеют один из профилей модификации, описанных в WO2018/107028 A1, поданной 8 декабря 2017 г., под названием «Chemically Modified Guide RNAs» («Химически модифицированные гидовые РНК»), содержание которой в полном объеме включено в данный документ посредством ссылки. В некоторых вариантах осуществления

гидовые РНК, описанные в данном документе, имеют один из профилей структуры/модификации, описанных в US20170114334, содержание которой в полном объеме включено в данный документ посредством ссылки. В некоторых вариантах осуществления гидовые РНК, описанные в данном документе, имеют один из профилей структуры/модификации, описанных в WO2017/136794, WO2017004279, US2018187186, US2019048338, содержание которых в полном объеме включено в данный документ посредством ссылки.

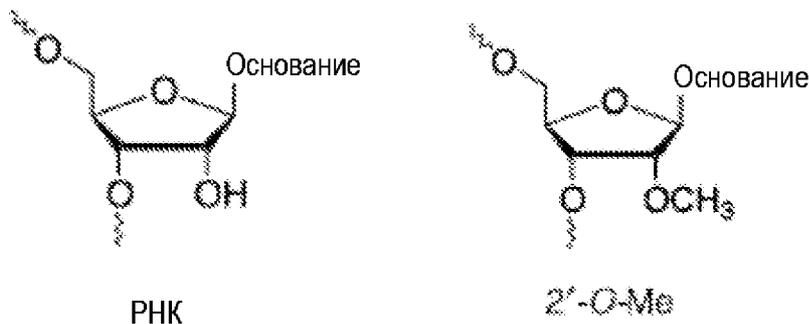
В некоторых вариантах осуществления модифицированная оРНК содержит следующую последовательность:

mN*mN*mN*NNNNNNNNNNNNNNNNNNNGUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU (SEQ ID NO: 300), где «N» может представлять собой любой природный или неприродный нуклеотид, а совокупность N составляет направляющую последовательность интрона 1 альбумина, описанную в таблицах 1, 10 и 12; и направляющие последовательности SERPINA1, описанные в таблице 2. Например, в данный документ включена SEQ ID NO: 300, где N заменены на любую из направляющих последовательностей, описанных в данном документе в таблице 1 (SEQ ID NO: 2-33) и/или таблице 2 (SEQ ID NO: 1000-1128).

Любая из модификаций, описанных ниже, может присутствовать в гРНК и мРНК, описанных в данном документе.

Термины «mA», «mC», «mU» или «mG» можно использовать для обозначения нуклеотида, который был модифицирован с помощью 2'-O-Me.

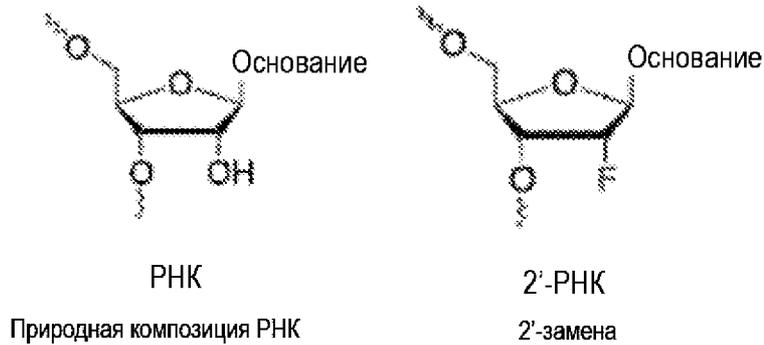
Модификацию 2'-O-метила можно проиллюстрировать следующим образом:



Другой химической модификацией, которая, как было показано, влияет на сахарные кольца нуклеотидов, является замещение галогеном. Например, замена 2'-фтор (2'-F) в сахарных кольцах нуклеотидов может повысить аффинность связывания олигонуклеотидов и стойкость к нуклеазам.

В данной заявке термины «fA», «fC», «fU» или «fG» можно использовать для обозначения нуклеотида, который был замещен 2'-F.

Замену 2'-F можно проиллюстрировать следующим образом:

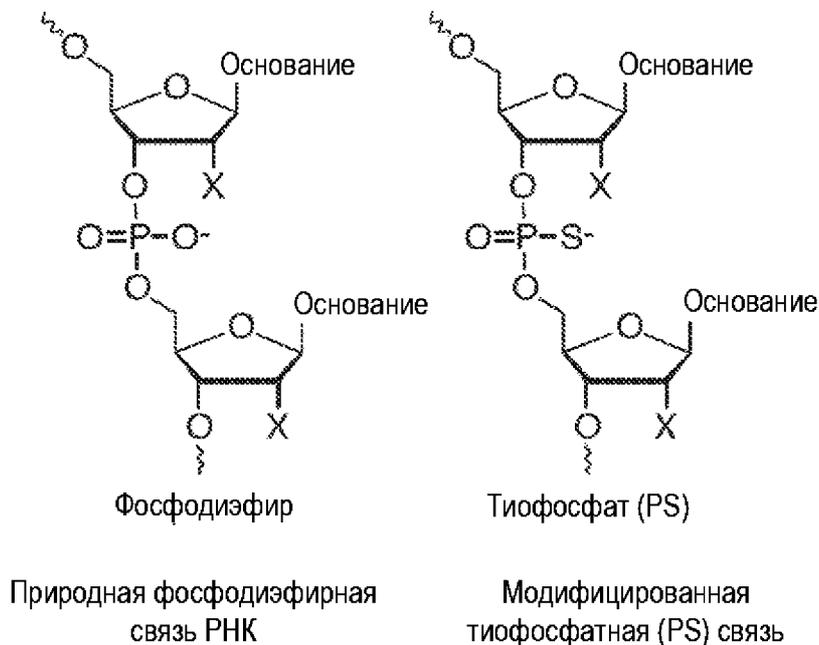


Тиофосфатная (PS) связь относится к связи, в которой атом серы замещен одним немостиковым фосфатным атомом кислорода в фосфодиэфирной связи, например, в связях между нуклеотидными основаниями. Когда тиофосфаты используют для создания олигонуклеотидов, модифицированные олигонуклеотиды также можно называть S-олигонуклеотидами.

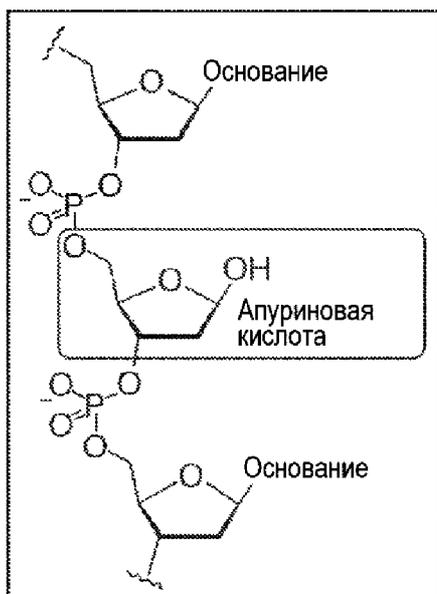
«*» можно использовать для обозначения модификации PS. В этой заявке термины A*, C*, U* или G* можно использовать для обозначения нуклеотида, связанного со следующим (например, 3') нуклеотидом посредством связи PS.

В этой заявке термины «mA*», «mC*», «mU*» или «mG*» можно использовать для обозначения нуклеотида, замещенного 2'-O-Me и связанного со следующим (например, 3') нуклеотидом посредством связи PS.

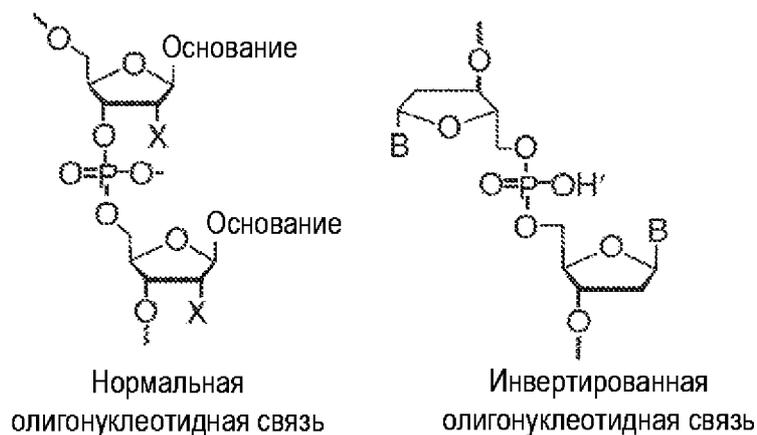
На диаграмме ниже проиллюстрировано замещение S- на немостиковый фосфатный атом кислорода с образованием связи PS вместо фосфодиэфирной связи:



Абазические нуклеотиды относятся к нуклеотидам, в которых отсутствуют азотистые основания. На фигуре ниже изображен олигонуклеотид с абазическим (также известным как апуриновый) сайтом, в котором отсутствует основание:



Инвертированные основания относятся к тем, связи которых инвертированы относительно нормальной связи 5' с 3' (т. е. связь 5' с 5' или связь 3' с 3'). Например:



Абазический нуклеотид может быть присоединен посредством инвертированной связи. Например, абазический нуклеотид может быть присоединен к концевому 5' нуклеотиду посредством связи 5' с 5', или абазический нуклеотид может быть присоединен к концевому 3' нуклеотиду посредством связи 3' с 3'. Инвертированный абазический нуклеотид в концевом 5' или 3' нуклеотиде также может называться инвертированным абазическим концевым кэпом.

В некоторых вариантах осуществления 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 осуществления модификация представляет собой 2'-O-Me, 2'-F, инвертированный абазический нуклеотид, связь PS или другую нуклеотидную модификацию, хорошо известную в данной области техники, для повышения стабильности и/или эффективности.

В некоторых вариантах осуществления первые четыре нуклеотида в 5' конце и последние четыре нуклеотида на 3' конце связаны тиофосфатными (PS) связями.

В некоторых вариантах осуществления первые три нуклеотида в 5' конце и

последние три нуклеотида в 3' конце содержат модифицированный 2'-О-метил (2'-O-Me) нуклеотид. В некоторых вариантах осуществления первые три нуклеотида в 5' конце и последние три нуклеотида в 3' конце содержат модифицированный 2'-фтором (2'-F) нуклеотид. В некоторых вариантах осуществления первые три нуклеотида в 5' конце и последние три нуклеотида в 3' конце содержат инвертированный абазический нуклеотид.

В некоторых вариантах осуществления любая из описанных в данном документе гидовых РНК включает модифицированную огРНК. В некоторых вариантах осуществления огРНК имеет профиль модификации, приведенный в SEQ ID NO: 200, где N представляет собой любой природный или неприродный нуклеотид, а совокупность N составляет направляющую последовательность (например, приведенную в таблице 1 или таблице 2), которая направляет нуклеазу к целевой последовательности (например, в интроне 1 альбумина человека или SERPINA1).

Как отмечено выше, в некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе композиция или состав содержат мРНК, содержащую открытую рамку считывания (ОРС), кодирующую РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, такой как Cas-нуклеаза, как описано в данном документе. В некоторых вариантах осуществления предложена, применяется или вводится мРНК, содержащая ОРС, кодирующую РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, такой как Cas-нуклеаза. Как описано ниже, мРНК, содержащая Cas-нуклеазу, может содержать Cas9-нуклеазу, такую как Cas9-нуклеаза *S. pyogenes*, обладающая кливазной, никазной и/или сайт-специфической ДНК-связывающей активностью. В некоторых вариантах осуществления ОРС, кодирующая РНК-направляемую ДНК-нуклеазу, представляет собой «ОРС модифицированного РНК-направляемого ДНК-связывающего агента» или просто «модифицированную ОРС», что используют как сокращение для обозначения того, что ОРС модифицирована.

ОРС Cas9, включая модифицированные ОРС Cas9, предложены в данном документе и известны в данной области техники. В качестве одного примера, ОРС Cas9 может быть кодон-оптимизированной так, чтобы кодирующая последовательность содержала один или более альтернативных кодонов для одной или более аминокислот. В контексте данного документа термин «альтернативный кодон» относится к вариациям в частоте использования кодонов для заданной аминокислоты и может быть или не быть предпочтительным или оптимизированным кодоном (кодон-оптимизированным) для заданной экспрессионной системы. Предпочтительное использование кодонов или кодоны, которые наиболее допустимы в заданной экспрессионной системе, известны в данной области техники. Кодирующие последовательности Cas9, мРНК Cas9 и белковые последовательности Cas9 по WO2013/176772, WO2014/065596, WO2016/106121 и WO2019/067910 включены в данный документ посредством ссылки. В частности, ORF и аминокислотные последовательности Cas9 из таблицы в параграфе [0449] WO2019/067910, а также мРНК и ORF Cas9 из параграфов [0214] - [0234] WO2019/067910 включены сюда посредством ссылки.

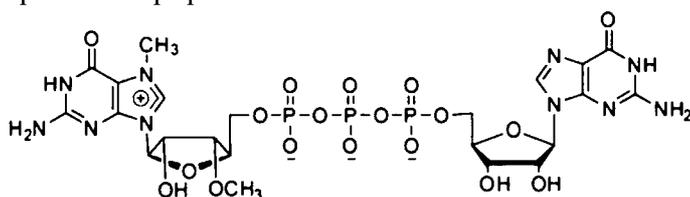
В некоторых вариантах осуществления модифицированная ОРС может содержать

модифицированный уридин по меньшей мере в одном, в нескольких или всех позициях уридина. В некоторых вариантах осуществления модифицированный уридин представляет собой уридин, модифицированный в позиции 5, например, галогеном, метилом или этилом. В некоторых вариантах осуществления модифицированный уридин представляет собой псевдоуридин, модифицированный в позиции 1, например, галогеном, метилом или этилом. Модифицированный уридин может представлять собой, например, псевдоуридин, N1-метил-псевдоуридин, 5-метоксиуридин, 5-йодуридин или их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления модифицированный уридин представляет собой 5-метоксиуридин. В некоторых вариантах осуществления модифицированный уридин представляет собой 5-йодуридин. В некоторых вариантах осуществления модифицированный уридин представляет собой псевдоуридин. В некоторых вариантах осуществления модифицированный уридин представляет собой N1-метил-псевдоуридин. В некоторых вариантах осуществления модифицированный уридин представляет собой комбинацию псевдоуридина и N1-метил-псевдоуридина. В некоторых вариантах осуществления модифицированный уридин представляет собой комбинацию псевдоуридина и 5-метоксиуридина. В некоторых вариантах осуществления модифицированный уридин представляет собой комбинацию N1-метил-псевдоуридина и 5-метоксиуридина. В некоторых вариантах осуществления модифицированный уридин представляет собой комбинацию 5-йодуридина и N1-метил-псевдоуридина. В некоторых вариантах осуществления модифицированный уридин представляет собой комбинацию псевдоуридина и 5-йодуридина. В некоторых вариантах осуществления модифицированный уридин представляет собой комбинацию 5-йодуридина и 5-метоксиуридина.

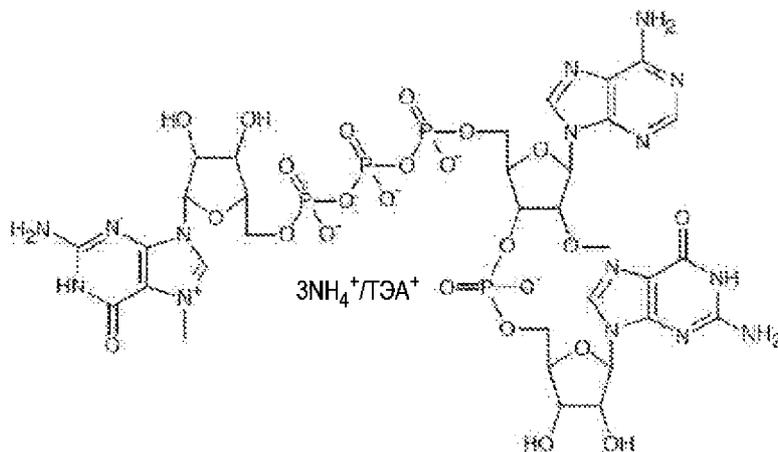
В некоторых вариантах осуществления описанная в данном документе мРНК содержит 5'-кэп, такой как Cap0, Cap1 или Cap2. 5'-кэп обычно представляет собой рибонуклеотид 7-метилгуанина (который может быть дополнительно модифицирован, как обсуждается ниже, например, в отношении ARCA), связанный посредством 5'-трифосфата с 5'-позицией первого нуклеотида 5'-к-3' цепи мРНК, т. е. первый кэп-проксимальный нуклеотид. В Cap0 рибозы первого и второго кэп-проксимальных нуклеотидов мРНК содержат 2'-гидроксил. В Cap1 рибозы первого и второго транскрибируемых нуклеотидов мРНК содержат 2'-метокси и 2'-гидроксил, соответственно. В Cap2 рибозы первого и второго кэп-проксимальных нуклеотидов мРНК содержат 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. Большинство эндогенных мРНК высших эукариот, включая мРНК млекопитающих, такие как мРНК человека, содержат Cap1 или Cap2. Cap0 и другие кэп-структуры, отличные от Cap1 и Cap2, могут быть иммуногенными у млекопитающих, таких как люди, вследствие распознавания их как «чужих» компонентами врожденной иммунной системы, такими как IFIT-1 и IFIT-5, что может привести к повышению уровня цитокинов, включая интерферон I типа. Компоненты врожденной иммунной системы, такие как IFIT-1 и IFIT-5, также могут

конкурировать с eIF4E за связывание мРНК с кэпом, отличным от Cap1 или Cap2, потенциально ингибируя трансляцию мРНК.

Кэп может быть включен котранскрипционно. Например, ARCA (англ. «anti-reverse cap analog»; Thermo Fisher Scientific, кат. № AM8045) представляет собой аналог кэпа, содержащий 7-метилгуанин-3'-метокси-5'-трифосфат, связанный с 5'-позицией рибонуклеотида гуанина, который может быть включен в транскрипт *in vitro* при инициации. ARCA приводит к получению кэпа Cap0, в котором 2'-позиция первого кэп-проксимального нуклеотида является гидроксилом. Смотрите, например, Stepinski et al., (2001) "Synthesis and properties of mRNAs containing the novel 'anti-reverse' cap analogs 7-methyl(3'-O-methyl)GpppG and 7-methyl(3'-deoxy)GpppG," RNA 7: 1486-1495. Структура ARCA проиллюстрирована ниже.



CleanCap™ AG (m7G(5')ppp(5')(2'OMeA)pG; TriLink Biotechnologies, кат. № N-7113) или CleanCap™ GG (m7G(5')ppp(5')(2'OMeG)pG; TriLink Biotechnologies, кат. № N-7133) можно использовать для обеспечения структуры Cap1 котранскрипционно. 3'-О-метилованные версии CleanCap™ AG и CleanCap™ GG также доступны от TriLink Biotechnologies под кат. №№ N-7413 и N-7433, соответственно. Структура CleanCap™ AG проиллюстрирована ниже.



В альтернативном варианте кэп можно добавлять к РНК посттранскрипционно. Например, кэпирующий фермент вируса осповакцины коммерчески доступен (New England Biolabs, кат. № M2080S) и обладает активностью РНК-трифосфатазы и гуанилилтрансферазы, обеспечиваемой субъединицей D1, и активностью гуанинметилтрансферазы, обеспечиваемой субъединицей D12. Таким образом, он может добавлять 7-метилгуанин к РНК с образованием Cap0 в присутствии S-аденозилметионина 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.

В некоторых вариантах осуществления мРНК дополнительно содержит полиаденилированный (поли-А) хвост. В некоторых вариантах осуществления поли-А-хвост содержит по меньшей мере 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100 оснований аденина, необязательно, до 300 оснований аденина. В некоторых вариантах осуществления поли-А-хвост содержит по меньшей мере 95, 96, 97, 98, 99 или 100 нуклеотидов аденина.

D. Донорные конструкции

Композиции и способы, описанные в данном документе, включают применение конструкции нуклеиновой кислоты, которая содержит последовательность, кодирующую гетерологичный ген ААТ (например, функционального ААТ или ААТ дикого типа), для вставки в сайт разреза, созданный гидовой РНК по настоящему изобретению и РНК-направляемым ДНК-связывающим агентом. В контексте данного документа такую конструкцию иногда называют «донорной конструкцией/матрицей». В некоторых вариантах осуществления конструкция представляет собой ДНК-конструкцию. Способы разработки и осуществления различных функциональных/структурных модификаций донорных конструкций известны в данной области техники. В некоторых вариантах осуществления конструкция может содержать одно или более из хвостовой последовательности полиаденилирования, последовательности сигнала полиаденилирования, сайта акцептора сплайсинга или селективного маркера. В некоторых вариантах осуществления хвостовая последовательность полиаденилирования кодируется, например, в виде участка «поли-А» в 3' конце кодирующей последовательности. Способы конструирования подходящей хвостовой последовательности полиаденилирования и/или последовательности сигнала полиаденилирования хорошо известны в данной области техники. Например, сигнальную последовательность полиаденилирования AAUAAA (SEQ ID NO: 800) обычно используют в системах млекопитающих, хотя были идентифицированы такие варианты, как UAUAAA (SEQ ID NO: 801) или AU/GUAAA (SEQ ID NO: 802). Смотрите, например, NJ Proudfoot, *Genes & Dev.* 25(17):1770-82, 2011.

Длина конструкции может варьироваться в зависимости от размера вставляемого гена и может составлять, например, от 200 пар оснований (п. о.) до около 5000 п. о., например, от около 200 п. о. до около 2000 п. о., например, от около 500 п. о. до около 1500 п. о. В некоторых вариантах осуществления длина донорной матрицы ДНК составляет около 200 п. о., или около 500 п. о., или около 800 п. о., или около 1000 пар оснований, или около 1500 пар оснований. В других вариантах осуществления длина донорной матрицы составляет по меньшей мере 200 п. о., или по меньшей мере 500 п. о., или по меньшей мере 800 п. о., или по меньшей мере 1000 п. о., или по меньшей мере 1500 п. о., или по меньшей мере 2000, или по меньшей мере 2500, или по меньшей мере 3000, или по меньшей мере 3500, или по меньшей мере 4000, или по меньшей мере 4500, или по меньшей мере 5000.

Конструкция может представлять собой ДНК или РНК, быть одноцепочечной, двухцепочечной или частично одно- и частично двухцепочечной, и может быть внесена в клетку-хозяин в линейной или кольцевой (например, мини-кольцевой) форме. Смотрите,

например, патентные публикации США №№ 2010/0047805, 2011/0281361, 2011/0207221. При введении в линейной форме концы донорной последовательности можно защитить (например, от экзонуклеолитической деградации) способами, известными специалистам в данной области техники. Например, к 3' концу линейной молекулы добавляют один или более дидезокси-нуклеотидных остатков и/или к одному или обоим концам лигируют самокомплементарные олигонуклеотиды. Смотрите, например, Chang et al. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:4959-4963; Nehls et al. (1996) Science 272:886-889. Дополнительные способы защиты экзогенных полинуклеотидов от деградации включают, но не ограничиваются этим, добавление концевой(ых) аминокислотной группы (аминокислот) и использование модифицированных межнуклеотидных связей, таких как, например, тиофосфаты, фосфорамидаты и остатки O-метилрибозы или дезоксирибозы. Конструкцию можно вносить в клетку как часть векторной молекулы, имеющей дополнительные последовательности, такие как, например, точки начала репликации, промоторы и гены, кодирующие устойчивость к антибиотикам. В конструкции могут отсутствовать вирусные элементы. Более того, донорные конструкции можно вносить в виде оголенной нуклеиновой кислоты, в виде комплекса нуклеиновой кислоты с агентом, таким как липосома или полксамер, или можно доставлять с помощью вирусов (например, аденовируса, AAV, вируса герпеса, ретровируса, лентивируса).

В некоторых вариантах осуществления конструкция может быть вставлена так, чтобы ее экспрессия находилась под управлением эндогенного промотора в сайте вставки (например, эндогенного промотора альбумина, когда донор интегрирован в локус альбумина клетки-хозяина). В таких случаях в трансгене могут отсутствовать регуляторные элементы (например, промотор и/или энхансер), которые управляют его экспрессией (например, конструкция без промотора). Тем не менее, будет очевидно, что в других случаях конструкция может содержать промотор и/или энхансер, например конститутивный промотор или индуцибельный или тканеспецифический (например, специфический для печени или тромбоцитов) промотор, который управляет экспрессией функционального белка после интеграции. Конструкция может содержать последовательность, кодирующую гетерологичный белок ААТ, расположенную ниже сигнальной последовательности, кодирующей сигнальный пептид, и функционально связанную с ней. В некоторых вариантах осуществления сигнальный пептид представляет собой сигнальный пептид из секретируемого гепатоцитами белка. В некоторых вариантах осуществления сигнальный пептид представляет собой сигнальный пептид ААТ. В некоторых вариантах осуществления сигнальный пептид представляет собой сигнальный пептид альбумина. В некоторых вариантах осуществления сигнальный пептид представляет собой сигнальный пептид фактора IX. Конструкция может содержать последовательность, кодирующую гетерологичный белок ААТ, расположенную ниже сигнальной последовательности, кодирующей сигнальный пептид ААТ, и функционально связанную с ней, например, SEQ ID NO: 700. Конструкция может содержать последовательность, кодирующую гетерологичный белок ААТ, расположенную ниже

сигнальной последовательности, кодирующей гетерологичный сигнальный пептид, и функционально связанную с ней. В различных вариантах осуществления способы включают последовательность, кодирующую гетерологичный белок ААТ, расположенную ниже сигнальной последовательности, кодирующей сигнальный пептид альбумина, и функционально связанную с ней (SEQ ID NO: 2000). В некоторых вариантах осуществления конструкция нуклеиновой кислоты работает при независимой от гомологии вставке нуклеиновой кислоты, которая кодирует белок ААТ. В некоторых вариантах осуществления конструкция нуклеиновой кислоты работает в неделящихся клетках, например, в клетках, в которых НГСК, а не ГР является основным механизмом, посредством которого происходит репарация двухцепочечных разрывов ДНК. Нуклеиновая кислота может представлять собой независимую от гомологии донорную конструкцию.

В некоторых вариантах осуществления донорная конструкция содержит гетерологичный ген ААТ, который кодирует функциональный белок ААТ. В некоторых вариантах осуществления функциональный белок ААТ представляет собой человеческую белковую последовательность ААТ дикого типа в соответствии с SEQ ID NO: 700. В некоторых вариантах осуществления функциональный белок ААТ представляет собой человеческую белковую последовательность ААТ дикого типа в соответствии с SEQ ID NO: 702. Кодирующая ААТ нуклеиновая кислота также проиллюстрирована и описана в данном документе. В некоторых вариантах осуществления конструкция содержит гетерологичный ген ААТ, который кодирует функциональный вариант ААТ, например, вариант, который обладает повышенной ингибирующей протеазы активностью по сравнению с ААТ дикого типа. В некоторых вариантах осуществления конструкция содержит гетерологичный ген ААТ, который кодирует функциональный вариант, который на 80%, 85%, 90%, 93%, 95%, 97%, 99% идентичен SEQ ID NO: 700, имеющей функциональную активность, которая составляет по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 92%, 94%, 96%, 98%, 99%, 100% или более активности по сравнению с ААТ дикого типа. В некоторых вариантах осуществления конструкция содержит гетерологичный ген ААТ, который кодирует функциональный вариант, который на 80%, 85%, 90%, 93%, 95%, 97%, 99% идентичен SEQ ID NO: 702, имеющей функциональную активность, которая составляет по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 92%, 94%, 96%, 98%, 99%, 100% или более активности по сравнению с ААТ дикого типа. В некоторых вариантах осуществления конструкция содержит гетерологичный ген ААТ, который кодирует фрагмент белка ААТ, обладающий функциональной активностью, которая составляет по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 92%, 94%, 96%, 98%, 99%, 100% или более активности по сравнению с ААТ дикого типа.

В данном документе также описаны двунаправленные конструкции нуклеиновых кислот, которые обеспечивают улучшенную вставку и экспрессию гетерологичного гена ААТ. Вкратце, различные описанные в данном документе двунаправленные конструкции содержат по меньшей мере два сегмента нуклеиновой кислоты, при этом один сегмент

(первый сегмент) содержит кодирующую последовательность, кодирующую гетерологичный ААТ (иногда взаимозаменяемо называемую в данном документе «трансгеном»), а другой сегмент (второй сегмент) содержит последовательность, в которой комплементарная последовательность кодирует гетерологичный ААТ. Двухнаправленные конструкции могут содержать по меньшей мере два сегмента нуклеиновой кислоты в *цис*-ориентации, причем один сегмент (первый сегмент) содержит кодирующую последовательность, которая кодирует гетерологичный ААТ в одной ориентации, тогда как другой сегмент (второй сегмент) содержит последовательность, в которой его комплементарная последовательность кодирует гетерологичный ААТ в другой ориентации. Это означает, что первый сегмент является комплементарным ко второму сегменту (не обязательно идеально комплементарным); комплементарная последовательность второго сегмента является обратной комплементарной последовательностью первого сегмента (не обязательно идеальной обратной комплементарной последовательностью, при условии, что обе кодируют гетерологичный ААТ). Двухнаправленная конструкция может содержать первую кодирующую последовательность, которая кодирует гетерологичный ААТ, связанный с акцептором сплайсинга, и вторую кодирующую последовательность, в которой комплементарная последовательность кодирует гетерологичный ААТ в другой ориентации, также связанный с акцептором сплайсинга. При использовании в сочетании с системой редактирования генов (например, системой CRISPR/Cas; системой цинк-пальцевой нуклеазы (ZFN); системой эффекторной нуклеазы, подобной активатору транскрипции (TALEN)), описанной в данном документе, двухнаправленность конструкций нуклеиновых кислот позволяет осуществлять вставку конструкции в любом направлении (не ограничивается вставкой в одном направлении) в целевой сайт вставки, обеспечивая экспрессию гетерологичного ААТ из а) кодирующей последовательности одного сегмента (например, левого сегмента, кодирующего «ЗФБ», верхняя левая конструкция ssAAV на Фиг. 1) или б) комплементарной последовательности другого сегмента (например, комплементарной последовательности правого сегмента, кодирующей «ЗФБ», как проиллюстрировано в перевернутом виде в верхней левой конструкции ssAAV на Фиг. 1), тем самым улучшая вставку и экспрессию, как проиллюстрировано в данном документе. При практической реализации настоящего изобретения можно использовать различные известные системы редактирования генов, включая, например, систему CRISPR/Cas; систему цинк-пальцевой нуклеазы (ZFN); систему эффекторной нуклеазы, подобной активатору транскрипции (TALEN).

Описанные в данном документе двухнаправленные конструкции могут быть модифицированы для включения любого подходящего структурного элемента, необходимого для любого конкретного применения и/или который обеспечивает одну или более необходимых функций. В некоторых вариантах осуществления описанная в данном документе двухнаправленная конструкция нуклеиновой кислоты не содержит плечи гомологии. В некоторых вариантах осуществления описанная в данном документе

двунаправленная конструкция нуклеиновой кислоты представляет собой независимую от гомологии донорную конструкцию. В некоторых вариантах осуществления, частично благодаря двунаправленной функции конструкции нуклеиновой кислоты, двунаправленную конструкцию можно вставлять в геномный локус в любом направлении (ориентации), как описано в данном документе, чтобы обеспечить эффективную вставку и/или экспрессию представляющего интерес полипептида (например, гетерологичного ААТ).

В некоторых вариантах осуществления двунаправленная конструкция нуклеиновой кислоты не содержит промотор, который управляет экспрессией гетерологичного гена ААТ. Например, экспрессия полипептида находится под управлением промотора клетки-хозяина (например, промотора эндогенного альбумина, когда трансген интегрирован в локус альбумина клетки-хозяина). В некоторых вариантах осуществления двунаправленная конструкция нуклеиновой кислоты содержит первый сегмент и второй сегмент, каждый из которых имеет акцептор сплайсинга, расположенный выше трансгена. В некоторых вариантах осуществления акцептор сплайсинга совместим с донорной последовательностью сплайсинга безопасного приемного сайта клетки-хозяина, например, с донором сплайсинга интрона 1 гена альбумина человека.

В некоторых вариантах осуществления двунаправленная конструкция нуклеиновой кислоты содержит первый сегмент, содержащий кодирующую последовательность гетерологичного ААТ, и второй сегмент, содержащий обратную комплементарную последовательность кодирующей последовательности гетерологичного ААТ. Таким образом, кодирующая последовательность в первом сегменте способна экспрессировать гетерологичный ААТ, тогда как комплементарная последовательность обратной комплементарной последовательности во втором сегменте также способна экспрессировать гетерологичный ААТ. В контексте данного документа термин «кодирующая последовательность» при описании второго сегмента, содержащего обратную комплементарную последовательность, относится к комплементарной (кодирующей) цепи второго сегмента (т. е. комплементарной кодирующей последовательности обратной комплементарной последовательности во втором сегменте).

В некоторых вариантах осуществления кодирующая последовательность, которая кодирует гетерологичный ААТ в первом сегменте, является менее чем на 100% комплементарной обратной комплементарной последовательности кодирующей последовательности, которая также кодирует гетерологичный ААТ. Это означает, что в некоторых вариантах осуществления первый сегмент содержит кодирующую последовательность (1) гетерологичного ААТ, а второй сегмент является обратной комплементарной последовательностью кодирующей последовательности (2) гетерологичного ААТ, причем кодирующая последовательность (1) не идентична с кодирующей последовательностью (2). Например, кодирующая последовательность (1) и/или кодирующая последовательность (2), которая кодирует гетерологичный ААТ, может являться кодон-оптимизированной так, что кодирующая последовательность (1) и

обратная комплементарная последовательность кодирующей последовательности (2) обладают менее 100% комплементарности. В некоторых вариантах осуществления кодирующая последовательность второго сегмента кодирует гетерологичный ААТ с использованием одного или более альтернативных кодонов для одной или более аминокислот того же самого (т. е. с одинаковой аминокислотной последовательностью) гетерологичного ААТ, кодируемого кодирующей последовательностью в первом сегменте. В контексте данного документа термин «альтернативный кодон» относится к вариациям в частоте использования кодонов для заданной аминокислоты и может быть или не быть предпочтительным или оптимизированным кодоном (кодон-оптимизированным) для заданной экспрессионной системы. Предпочтительное использование кодонов или кодоны, которые наиболее допустимы в заданной экспрессионной системе, известны в данной области техники.

В некоторых вариантах осуществления второй сегмент содержит обратную комплементарную последовательность, для которой характерно использование кодонов, отличное от кодирующей последовательности первого сегмента, чтобы снизить вероятность образования шпильки. Такая обратная комплементарная последовательность спаривается по основаниям не со всеми нуклеотидами кодирующей последовательности в первом сегменте, но, необязательно, она кодирует тот же самый полипептид. В таких случаях кодирующая последовательность, например, для полипептида А, первого сегмента может быть гомологичной, но не идентичной кодирующей последовательности, например, для полипептида А, второй половины двунаправленной конструкции. В некоторых вариантах осуществления второй сегмент содержит обратную комплементарную последовательность, которая не является по существу комплементарной (например, не более чем на 70% комплементарной) кодирующей последовательности в первом сегменте. В некоторых вариантах осуществления второй сегмент содержит обратную комплементарную последовательность, которая не является существенно комплементарной (например, по меньшей мере на 90% комплементарной) кодирующей последовательности в первом сегменте. В некоторых вариантах осуществления второй сегмент содержит обратную комплементарную последовательность, имеющую по меньшей мере около 30%, около 35%, около 40%, около 45%, около 50%, около 55%, около 60%, около 65%, около 70%, около 75%, около 80%, около 85%, около 90%, около 95%, около 97% или около 99% комплементарности с кодирующей последовательностью в первом сегменте.

В некоторых вариантах осуществления второй сегмент содержит обратную комплементарную последовательность, имеющую 100% комплементарности с кодирующей последовательностью в первом сегменте. Это означает, что последовательность второго сегмента является идеальной обратной комплементарной последовательностью кодирующей последовательности в первом сегменте. В качестве примера, первый сегмент содержит гипотетическую последовательность 5' CTGGACCGA 3' (SEQ ID NO: 500), а второй сегмент содержит обратную комплементарную

последовательность SEQ ID NO: 500, т. е. 5' TCGGTCCAG 3' (SEQ ID NO: 502).

В некоторых вариантах осуществления двунаправленная конструкция нуклеиновой кислоты содержит первый сегмент, содержащий кодирующую последовательность полипептида или агента (например, первого полипептида), и второй сегмент, содержащий обратную комплементарную последовательность кодирующей последовательности полипептида или агента (например, второго полипептида). В некоторых вариантах осуществления первый полипептид и второй полипептид являются одинаковыми, как описано выше. В некоторых вариантах осуществления первый терапевтический агент и второй терапевтический агент являются одинаковыми, как описано выше. В некоторых вариантах осуществления первый полипептид и второй полипептид являются разными. В некоторых вариантах осуществления первый терапевтический агент и второй терапевтический агент являются разными. Например, первый полипептид представляет собой полипептид А, а второй полипептид представляет собой полипептид В. В качестве дополнительного примера, первый полипептид представляет собой полипептид А, а второй полипептид представляет собой вариант (например, фрагмент (такой как функциональный фрагмент), мутант, слияние (включая добавление хотя бы одной аминокислоты в конце полипептида) или их комбинацию) полипептида А.

Кодирующая последовательность, которая кодирует полипептид, может, необязательно, содержать одну или более дополнительных последовательностей, таких как последовательности, кодирующие амино- или карбокси-концевые аминокислотные последовательности, такие как сигнальная последовательность, последовательность метки или гетерологичная функциональная последовательность (например, последовательность ядерной локализации (СЯЛ)), связанные с полипептидом. Кодирующая последовательность, которая кодирует полипептид, может, необязательно, содержать последовательности, кодирующие одну или более амино-концевых сигнальных пептидных последовательностей. Каждая из этих дополнительных последовательностей может быть одинаковой или разной в первом и втором сегментах конструкции.

Описанную в данном документе двунаправленную конструкцию можно использовать для экспрессии ААТ, как описано в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления двунаправленная конструкция нуклеиновой кислоты является линейной. Например, первый и второй сегменты соединены линейным образом посредством линкерной последовательности. В некоторых вариантах осуществления 5' конец второго сегмента, который содержит обратную комплементарную последовательность, связан с 3' концом первого сегмента. В некоторых вариантах осуществления 5' конец первого сегмента связан с 3' концом второго сегмента, который содержит обратную комплементарную последовательность. В некоторых вариантах осуществления длина линкерной последовательности составляет около 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 150, 200, 250, 300, 500, 1000, 1500, 2000 или более нуклеотидов. Как понятно специалистам в данной области техники, между первым и вторым сегментами могут быть

вставлены другие структурные элементы в дополнение к линкерной последовательности или вместо нее.

Описанные в данном документе конструкции могут быть модифицированы для включения любого подходящего структурного элемента, необходимого для любого конкретного применения и/или который обеспечивает одну или более необходимых функций. В некоторых вариантах осуществления описанная в данном документе двунаправленная конструкция нуклеиновой кислоты не содержит плечи гомологии. В некоторых вариантах осуществления, частично благодаря двунаправленной функции конструкции нуклеиновой кислоты, двунаправленную конструкцию можно вставлять в геномный локус в любом направлении, как описано в данном документе, чтобы обеспечить эффективную вставку и/или экспрессию представляющего интерес полипептида.

В некоторых вариантах осуществления один или оба из первого и второго сегментов содержат хвостовую последовательность полиаденилирования и/или сигнальную последовательность полиаденилирования ниже открытой рамки считывания. В некоторых вариантах осуществления хвостовая последовательность полиаденилирования кодируется, например, в виде участка «поли-А» в 3' конце первого и/или второго сегмента. В некоторых вариантах осуществления хвостовую последовательность полиаденилирования обеспечивают котранскрипционно как результат сигнальной последовательности полиаденилирования, которая кодируется в 3' конце первого и/или второго сегмента или вблизи него. Способы конструирования подходящей хвостовой последовательности полиаденилирования и/или последовательности сигнала полиаденилирования хорошо известны в данной области техники. Подходящие акцепторные последовательности сплайсинга описаны и проиллюстрированы в данном документе, включая мышинный альбумин и человеческие акцепторные сайты FIX. В некоторых вариантах осуществления сигнальную последовательность полиаденилирования AAUAAA (SEQ ID NO: 800) обычно используют в системах млекопитающих, хотя были идентифицированы такие варианты, как UAUAAA (SEQ ID NO: 801) или AU/GUAAA (SEQ ID NO: 802). Смотрите, например, NJ Proudfoot, *Genes & Dev.* 25(17):1770-82, 2011. В некоторых вариантах осуществления включена хвостовая последовательность поли-А.

В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе конструкции могут представлять собой ДНК или РНК, быть одноцепочечными, двухцепочечными или частично одно- и частично двухцепочечными. Например, конструкции могут представлять собой одноцепочечную или двухцепочечную ДНК. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота может быть модифицирована (например, с использованием аналогов нуклеозидов), как описано в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе конструкции содержат акцепторный сайт сплайсинга в одном или обоих концах конструкции, например, 5' относительно открытой рамки считывания в первом и/или

втором сегментах, или 5' относительно последовательностей одного или обоих трансенов. В некоторых вариантах осуществления акцепторный сайт сплайсинга содержит NAG. В дополнительных вариантах осуществления акцепторный сайт сплайсинга состоит из NAG. В некоторых вариантах осуществления акцептор сплайсинга представляет собой акцептор сплайсинга альбумина, например, акцептор сплайсинга альбумина, используемый при сплайсинге экзонов 1 и 2 альбумина. В некоторых вариантах осуществления акцептор сплайсинга получен из гена альбумина человека. В некоторых вариантах осуществления акцептор сплайсинга получен из гена альбумина мыши. В некоторых вариантах осуществления акцептор сплайсинга представляет собой мышинный акцептор сплайсинга альбумина, например, мышинный акцептор сплайсинга альбумина, используемый при сплайсинге экзонов 1 и 2 альбумина. В некоторых вариантах осуществления акцептор сплайсинга получен из гена альбумина человека. Дополнительные подходящие акцепторные сайты сплайсинга, используемые у эукариот, включая искусственные акцепторы сплайсинга, известны и могут быть получены из уровня техники. Смотрите, например, Shapiro, et al., 1987, *Nucleic Acids Res.*, 15, 7155-7174, Burset, et al., 2001, *Nucleic Acids Res.*, 29, 255-259.

В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе конструкции могут быть модифицированы в одном или обоих концах, чтобы включать, при необходимости, один или более подходящих структурных элементов и/или для обеспечения одного или более функциональных преимуществ. Например, структурные модификации могут варьироваться в зависимости от способа(ов), используемого(ых) для доставки описанных в данном документе конструкций в клетку-хозяина, например, доставки на основе вирусного вектора или упаковки в липидные наночастицы для доставки. Такие модификации включают, без ограничения, например, концевые структуры, такие как инвертированные концевые повторы (ИКП), шпильки, петли и другие структуры, такие как тороид. В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе конструкции содержат один, два или три ИКП. В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе конструкции содержат не более двух ИКП. В данной области техники известны различные способы структурных модификаций.

В некоторых вариантах осуществления один или оба конца конструкции могут быть защищены (например, от экзонуклеолитической деградции) способами, известными специалистам в данной области техники. Например, к 3' концу линейной молекулы добавляют один или более дидезоксинуклеотидных остатков и/или к одному или обоим концам лигируют самокомплементарные олигонуклеотиды. Смотрите, например, Chang et al. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:4959-4963; Nehls et al. (1996) *Science* 272:886-889. Дополнительные способы защиты конструкций от деградции включают, но не ограничиваются этим, добавление концевой(ых) аминокислотной группы (аминокислот) и использование модифицированных межнуклеотидных связей, таких как, например, тиофосфаты, фосфорамидаты и остатки О-метилрибозы или дезоксирибозы.

В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе

конструкции можно вносить в клетку как часть вектора, имеющего дополнительные последовательности, такие как, например, точки начала репликации, промоторы и гены, кодирующие устойчивость к антибиотикам. В некоторых вариантах осуществления конструкции можно вносить в виде оголенной нуклеиновой кислоты, в виде комплекса нуклеиновой кислоты с агентом, таким как липосома, полимер или поллоксамер, или можно доставлять с помощью вирусных векторов (например, аденовируса, AAV, вируса герпеса, ретровируса, лентивируса).

В некоторых вариантах осуществления изобретения, хотя это и не требуется для экспрессии, описанные в данном документе конструкции могут также содержать транскрипционные или трансляционные регуляторные последовательности, например, промоторы, энхансеры, инсуляторы, сайты внутренней посадки рибосомы, последовательности, кодирующие пептиды, и/или сигналы полиаденилирования.

В некоторых вариантах осуществления конструкции, содержащие кодирующую последовательность представляющего интерес полипептида, могут содержать одну или более из следующих модификаций: оптимизацию кодонов (например, в отношении кодонов человека) и/или добавление одного или более сайтов гликозилирования. Смотрите, например, McIntosh et al. (2013) *Blood* (17):3335-44.

Е. Система редактирования генов

При практической реализации настоящего изобретения для нацеленной вставки гетерологичного гена ААТ можно использовать различные известные системы редактирования генов, включая, например, систему CRISPR/Cas; систему цинк-пальцевой нуклеазы (ZFN); и систему эффекторной нуклеазы, подобной активатору транскрипции (TALEN). Как правило, системы редактирования генов включают использование сконструированных систем расщепления для индукции двухцепочечного разрыва (ДЦР) или ника (например, одноцепочечного разрыва или ОЦР) в целевой последовательности ДНК. Расщепление или создание одноцепочечного разрыва может происходить за счет применения специфических нуклеаз, таких как сконструированные ZFN, TALEN, или применения системы CRISPR/Cas со сконструированной гидовой РНК для управления специфическим расщеплением или созданием одноцепочечного разрыва в целевой последовательности ДНК. Кроме того, уже были разработаны нацеленные нуклеазы, и дополнительные нуклеазы находятся на стадии разработки, например, основе системы Argonaute (например, из *T. thermophilus*, известного как «TtAgo», смотрите Swarts et al (2014) *Nature* 507(7491): 258-261), которые также могут иметь потенциал для применения в редактировании генома и генной терапии.

Следует понимать, что в случае способов, в которых используют описанные в данном документе гидовые РНК для Cas-нуклеазы, такой как Cas9-нуклеаза, эти способы включают применение системы CRISPR/Cas (и любой из описанных в данном документе донорных конструкций, которые содержат последовательность, кодирующую гетерологичный ААТ). Также следует принять во внимание, что настоящее изобретение предусматривает способы нацеленной вставки и экспрессии гетерологичного ААТ с

использованием двунаправленных конструкций, описанных в данном документе, которые можно осуществлять с или без гидовых РНК альбумина, описанных в данном документе (например, с использованием системы ZFN, чтобы обеспечить разрыв в целевой последовательности ДНК, создающий сайт для вставки двунаправленной конструкции).

В некоторых вариантах осуществления можно использовать систему CRISPR/Cas (например, гидовая РНК и РНК-направляемый ДНК-связывающий агент), чтобы создать сайт вставки в необходимом локусе в геноме хозяина, причем в этом сайте может быть вставлена донорная конструкция (например, двунаправленная конструкция), содержащая последовательность, кодирующую гетерологичный ААТ, описанный в данном документе, для экспрессии гетерологичного ААТ. В некоторых вариантах осуществления гетерологичный трансген ААТ может быть гетерологичным по отношению к сайту его вставки, например, вставки в безопасный приемный локус, как описано в данном документе. В некоторых вариантах осуществления описанную в данном документе гидовую РНК (SEQ ID NO: 2-33), нацеленную на локус альбумина человека (например, интрон 1), можно использовать в соответствии с представленными способами с РНК-направляемым ДНК-связывающим агентом (например, Cas-нуклеазой) для создания сайта вставки, в котором может быть вставлена донорная конструкция (например, двунаправленная конструкция), содержащая последовательность, кодирующую гетерологичный ААТ, для экспрессии гетерологичного ААТ. Гидовые РНК, содержащие направляющие последовательности для нацеленной вставки гетерологичного гена ААТ в интрон 1 локуса альбумина человека, проиллюстрированы и описаны в данном документе (смотрите, например, таблицу 1).

Способы применения различных РНК-направляемых ДНК-связывающих агентов, например, нуклеазы, такой как Cas-нуклеаза, например, Cas9, также хорошо известны в данной области техники. Следует понимать, что, в зависимости от контекста, РНК-направляемый ДНК-связывающий агент может быть предоставлен в виде нуклеиновой кислоты (например, ДНК или мРНК) или в виде белка. В некоторых вариантах осуществления представленный способ можно реализовать на практике в клетке-хозяине, которая уже экспрессирует РНК-направляемый ДНК-связывающий агент.

В некоторых вариантах осуществления РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, такой как Cas9-нуклеаза, обладает активностью кливазы, которую также можно назвать двухцепочечной эндонуклеазной активностью. В некоторых вариантах осуществления РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, такой как Cas9-нуклеаза, обладает активностью нуклеазы, которую также можно назвать одноцепочечной эндонуклеазной активностью. В некоторых вариантах осуществления РНК-направляемый ДНК-связывающий агент содержит собой Cas-нуклеазу. Примеры Cas9-нуклеаз включают системы CRISPR типа II *S. pyogenes*, *S. aureus* и других прокариот (смотрите, например, перечень в следующем параграфе), а также их мутантные (например, сконструированные или другие варианты) версии. Смотрите, например, US2016/0312198 A1; US 2016/0312199 A1.

Неограничивающие типовые виды, из которых можно получать Cas-нуклеазу, включают *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus thermophilus*, *Streptococcus sp.*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria innocua*, *Lactobacillus gasseri*, *Francisella novicida*, *Wolinella succinogenes*, *Sutterella wadsworthensis*, *Gamma proteobacterium*, *Neisseria meningitidis*, *Campylobacter jejuni*, *Pasteurella multocida*, *Fibrobacter succinogenes*, *Rhodospirillum rubrum*, *Nocardiosis 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*, *Natranaerobius thermophilus*, *Pelotomaculum thermopropionicum*, *Acidithiobacillus caldus*, *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Allochrochromatium 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.*, бактерию *Lachnospiraceae ND2006* и *Acaryochloris marina*.

В некоторых вариантах осуществления Cas-нуклеаза представляет собой Cas9-нуклеазу из *Streptococcus pyogenes*. В некоторых вариантах осуществления Cas-нуклеаза представляет собой Cas9-нуклеазу из *Streptococcus thermophilus*. В некоторых вариантах осуществления Cas-нуклеаза представляет собой Cas9-нуклеазу из *Neisseria meningitidis*. В некоторых вариантах осуществления Cas-нуклеаза представляет собой Cas9-нуклеазу из *Staphylococcus aureus*. В некоторых вариантах осуществления Cas-нуклеаза представляет собой Cpf1-нуклеазу из *Francisella novicida*. В некоторых вариантах осуществления Cas-нуклеаза представляет собой Cpf1-нуклеазу из *Acidaminococcus sp.* В некоторых вариантах осуществления Cas-нуклеаза представляет собой Cpf1-нуклеазу из бактерии *Lachnospiraceae ND2006*. В дополнительных вариантах осуществления Cas-нуклеаза представляет собой Cpf1-нуклеазу 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 mascaea*. В определенных вариантах осуществления Cas-нуклеаза представляет собой Cpf1-нуклеазу из *Acidaminococcus* или *Lachnospiraceae*.

В некоторых вариантах осуществления гРНК вместе с РНК-направляемым ДНК-связывающим агентом называется рибонуклеопротеиновым комплексом (РНП). В

некоторых вариантах осуществления РНК-направляемый ДНК-связывающий агент представляет собой Cas-нуклеазу. В некоторых вариантах осуществления гРНК вместе с Cas-нуклеазой называется Cas-РНП. В некоторых вариантах осуществления РНП содержит компоненты типа I, типа II или типа III. В некоторых вариантах осуществления Cas-нуклеаза представляет собой белок Cas9 из системы CRISPR/Cas типа II. В некоторых вариантах осуществления гРНК вместе с Cas9 называется Cas9-РНП.

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

В некоторых вариантах осуществления используют химерные Cas-нуклеазы, в которых один домен или область белка заменены частью другого белка. В некоторых вариантах осуществления домен Cas-нуклеазы может быть заменен доменом другой нуклеазы, такой как FokI. В некоторых вариантах осуществления Cas-нуклеаза может представлять собой модифицированную нуклеазу.

В других вариантах осуществления Cas-нуклеаза может быть получена из системы CRISPR/Cas типа I. В некоторых вариантах осуществления Cas-нуклеаза может быть компонентом комплекса Cascade системы CRISPR/Cas типа I. В некоторых вариантах осуществления Cas-нуклеаза может представлять собой белок Cas3. В некоторых вариантах осуществления Cas-нуклеаза может быть получена из системы CRISPR/Cas типа III. В некоторых вариантах осуществления Cas-нуклеаза может обладать активностью расщепления РНК.

В некоторых вариантах осуществления РНК-направляемый ДНК-связывающий агент обладает одноцепочечной никазной активностью, т. е. может надрезать одну цепь ДНК с образованием одноцепочечного разрыва, также известного как «ник». В некоторых вариантах осуществления РНК-направляемый ДНК-связывающий агент содержит собой Cas-никазу. Никаза представляет собой фермент, который создает ник в дцДНК, т. е. надрезает одну цепь двойной спирали ДНК, но не другую. В некоторых вариантах осуществления Cas-никаза представляет собой версию Cas-нуклеазы (например, Cas-нуклеазы, обсуждаемой выше), в которой эндонуклеолитический активный сайт инактивирован, например, за счет одного или более изменений (например, точечных мутаций) в каталитическом домене. Смотрите, например, патент США № 8889356 в отношении обсуждения Cas-никаз и типовых изменений каталитических доменов. В некоторых вариантах осуществления Cas-никаза, такая как Cas9-никаза, имеет инактивированный домен RuvC или HNH.

В некоторых вариантах осуществления РНК-направляемый ДНК-связывающий агент модифицирован так, чтобы содержать только один функциональный нуклеазный домен. Например, белок агента может быть модифицирован так, чтобы один из доменов

нуклеазы был мутирован или полностью или частично удален, чтобы снизить его активность расщепления нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления используют никазу, имеющую домен RuvC со сниженной активностью. В некоторых вариантах осуществления используют никазу, имеющую неактивный домен RuvC. В некоторых вариантах осуществления используют никазу, имеющую домен HNH со сниженной активностью. В некоторых вариантах осуществления используют никазу, имеющую неактивный домен HNH.

В некоторых вариантах осуществления консервативная аминокислота в нуклеазном домене белка Cas заменена для снижения или изменения нуклеазной активности. В некоторых вариантах осуществления Cas-нуклеаза может содержать аминокислотную замену в RuvC или RuvC-подобном нуклеазном домене. Примеры аминокислотных замен в RuvC или RuvC-подобном нуклеазном домене включают D10A (на основе белка Cas9 *S. pyogenes*). Смотрите, например, Zetsche et al. (2015) Cell Oct 22:163(3): 759-771. В некоторых вариантах осуществления Cas-нуклеаза может содержать аминокислотную замену в HNH или HNH-подобном нуклеазном домене. Примеры аминокислотных замен в HNH или HNH-подобном нуклеазном домене включают E762A, H840A, N863A, H983A и D986A (на основе белка Cas9 *S. pyogenes*). Смотрите, например, Zetsche et al. (2015). Дополнительные типовые аминокислотные замены включают D917A, E1006A и D1255A (на основе последовательности *Francisella novicida* U112 Cpf1 (FnCpf1) (UniProtKB - A0Q7Q2 (CPF1_FRATN))).

В некоторых вариантах осуществления никаза предоставлена в комбинации с парой гидовых РНК, комплементарных смысловой и антисмысловой цепям целевой последовательности, соответственно. В этом варианте осуществления гидовые РНК направляют никазу к целевой последовательности и вносят ДЦР, создавая ники на противоположных цепях целевой последовательности (т. е. создание двойного ника). В некоторых вариантах осуществления никазу используют с двумя отдельными гидовыми РНК, нацеленными на противоположные цепи ДНК, для создания двойного ника в целевой ДНК. В некоторых вариантах осуществления никазу используют с двумя отдельными гидовыми РНК, выбранными так, чтобы находиться в непосредственной близости, для создания двойного ника в целевой ДНК.

В некоторых вариантах осуществления РНК-направляемый ДНК-связывающий агент содержит один или более гетерологичных функциональных доменов (например, представляет собой или содержит слитый полипептид).

В некоторых вариантах осуществления гетерологичный функциональный домен может облегчить перенос РНК-направляемого ДНК-связывающего агента в ядро клетки. Например, гетерологичный функциональный домен может представлять собой сигнал ядерной локализации (СЯЛ). В некоторых вариантах осуществления РНК-направляемый ДНК-связывающий агент может быть слит с 1-10 СЯЛ. В некоторых вариантах осуществления РНК-направляемый ДНК-связывающий агент может быть слит с 1-5 СЯЛ. В некоторых вариантах осуществления РНК-направляемый ДНК-связывающий агент

может быть слит с одним СЯЛ. В случае применения одного СЯЛ, он может быть связан с N-концом или C-концом последовательности РНК-направляемого ДНК-связывающего агента. Он также может быть вставлен в последовательность РНК-направляемого ДНК-связывающего агента. В других вариантах осуществления РНК-направляемый ДНК-связывающий агент может быть слит с более чем одним СЯЛ. В некоторых вариантах осуществления РНК-направляемый ДНК-связывающий агент может быть слит с 2, 3, 4 или 5 СЯЛ. В некоторых вариантах осуществления РНК-направляемый ДНК-связывающий агент может быть слит с двумя СЯЛ. В определенных обстоятельствах два СЯЛ могут быть одинаковыми (например, два СЯЛ SV40) или разными. В некоторых вариантах осуществления РНК-направляемый ДНК-связывающий агент слит с двумя последовательностями СЯЛ SV40, присоединенными в карбокси-конце. В некоторых вариантах осуществления РНК-направляемый ДНК-связывающий агент может быть слит с двумя СЯЛ, одним, присоединенным в N-конце, и другим, присоединенным в C-конце. В некоторых вариантах осуществления РНК-направляемый ДНК-связывающий агент может быть слит с 3 СЯЛ. В некоторых вариантах осуществления РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, может не быть слит с СЯЛ. В некоторых вариантах осуществления СЯЛ может быть однокомпонентной последовательностью, такой как, например, СЯЛ SV40, РКККРКV (SEQ ID NO: 600) или РКККRRV (SEQ ID NO: 601). В некоторых вариантах осуществления СЯЛ может быть двухкомпонентной последовательностью, такой как СЯЛ нуклеоплазмина, КРРААТККАGQAKKKK (SEQ ID NO: 602). В конкретном варианте осуществления одна РКККРКV (SEQ ID NO: 600) СЯЛ может быть присоединена в C-конце РНК-направляемого ДНК-связывающего агента. В сайт слияния, необязательно, включены один или более линкеров.

Способы доставки

Гидовую РНК (гРНК альбумина; гРНК SERPINA1), РНК-направляемый ДНК-связывающий агент (например, Cas-нуклеазу) и конструкции нуклеиновых кислот (например, двунаправленную конструкцию), описанные в данном документе, можно доставлять в клетку-хозяина или организм субъекта *in vivo* или *ex vivo*, используя различные известные и подходящие способы, доступные в данной области техники. Гидовую РНК, РНК-направляемые ДНК-связывающие агенты и конструкции нуклеиновых кислот можно доставлять по отдельности или вместе в любой комбинации, используя одинаковые или разные способы доставки в зависимости от ситуации.

Для внесения описанной в данном документе гидовой РНК, а также РНК-направляемого ДНК-связывающего агента и донорной конструкции в клетки (например, клетки млекопитающих) и целевые ткани можно использовать обычные способы доставки генов на вирусной и невирусной основе. В данном документе дополнительно предложены нуклеиновые кислоты систем доставки на основе невирусных векторов, таких как невирусные векторы, плазмидные векторы и, например, оголенная нуклеиновая кислота, и нуклеиновая кислота в комплексе с носителем для доставки, таким как липосома, липидная наночастица (ЛПЧ) или полуксамер. Системы доставки на основе вирусных

векторов включают ДНК- и РНК-вирусы.

Способы и композиции для невирусной доставки нуклеиновых кислот включают электропорацию, липофекцию, микроинъекцию, биолистику, виросомы, липосомы, иммунолипосомы, ЛНЧ, конъюгаты нуклеиновых кислот с поликатионами или липидами, оголенную нуклеиновую кислоту (например, оголенную ДНК/РНК), искусственные вирионы и усиленное агентом поглощение ДНК. Также для доставки нуклеиновых кислот можно использовать обработку ультразвуком, например, с помощью системы Sonitron 2000 system (Rich-Mar).

Дополнительные типовые системы для доставки нуклеиновых кислот включают предоставляемые AmaxaBiosystems (Cologne, Germany), Maxcyte, Inc. (Rockville, Md.), VTX Molecular Delivery Systems (Holliston, Ma.) и Copernicus Therapeutics Inc., (смотрите, например, патент США № 6008336). Липофекция описана, например, в патентах США №№ 5049386; 4946787; и 4897355), а реагенты для липофекции продаются на коммерческой основе (например, Transfectam™ и Lipofectin™). Получение комплексов липид:нуклеиновая кислота, включая нацеленные липосомы, такие как иммунолипидные комплексы, хорошо известно в данной области техники и описано в данном документе.

Различные системы доставки (например, векторы, липосомы, ЛНЧ), содержащие гидовые РНК, РНК-направляемый ДНК-связывающий агент и донорную конструкцию, отдельно или в комбинации, также можно вводить в организм для доставки в клетки *in vivo* или вводить в клетку или клеточную культуру *ex vivo*. Введение осуществляют любым из способов, обычно используемых для итогового приведения молекулы в контакт с кровью, жидкостью или клетками, включая, но не ограничиваясь этим, инъекцию, инфузию, местное нанесение и электропорацию. Подходящие способы введения таких нуклеиновых кислот доступны и хорошо известны специалистам в данной области техники.

В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложены ДНК- или РНК-векторы, кодирующие любые одну или более описанных в данном документе композиций, например, гидовую РНК (гРНК альбумина; и/или гРНК SERPINA1), содержащую любые одну или более их описанных в данном документе направляющих последовательностей; или конструкция (например, двунаправленная конструкция), содержащая последовательность, кодирующую гетерологичный ААТ; или последовательность, кодирующую РНК-направляемый ДНК-связывающий агент. В определенных вариантах осуществления изобретение включает ДНК- или РНК-векторы, кодирующие любую одну или более из описанных в данном документе композиций или в любой комбинации. В некоторых вариантах осуществления векторы дополнительно содержат, например, промоторы, энхансеры и регуляторные последовательности. В некоторых вариантах осуществления вектор, который содержит двунаправленную конструкцию, содержащую последовательность, кодирующую гетерологичный ААТ, не содержит промотор, который управляет экспрессией гетерологичного ААТ. В некоторых вариантах осуществления вектор, который содержит гидовую РНК, содержащую любую

одну или более из описанных в данном документе направляющих последовательностей (гРНК альбумина; и/или гРНК SERPINA1), также содержит одну или более нуклеотидных последовательностей, кодирующих сгРНК, trРНК или сгРНК и trРНК, как описано в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления вектор содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую описанную в данном документе гидовую РНК (гРНК альбумина; и/или гРНК SERPINA1). В некоторых вариантах осуществления вектор содержит одну копию гидовой РНК. В других вариантах осуществления вектор содержит более одной копии гидовой РНК. В вариантах осуществления с более чем одной гидовой РНК гидовые РНК могут быть неидентичными в том смысле, что они нацелены на разные целевые последовательности, или могут быть идентичными в том смысле, что они нацелены на одну и ту же целевую последовательность. В некоторых вариантах осуществления, в которых векторы содержат более одной гидовой РНК, каждая гидовая РНК может обладать другими отличными свойствами, такими как активность или стабильность в комплексе с РНК-направляемой ДНК-нуклеазой, например, комплексе РНП Cas. В некоторых вариантах осуществления нуклеотидная последовательность, кодирующая гидовую РНК, может быть функционально связана по меньшей мере с одной транскрипционной или трансляционной регуляторной последовательностью, такой как промотор, 3' НТО или 5' НТО. В одном варианте осуществления промотор может представлять собой промотор tРНК, например, tРНК^{Lys3} или химерой tРНК. Смотрите Mefferd et al., RNA. 2015 21:1683-9; Scherer et al., Nucleic Acids Res. 2007 35: 2620-2628. В некоторых вариантах осуществления промотор может распознаваться РНК-полимеразой III (Pol III). Неограничивающие примеры промоторов Pol III включают промоторы U6 и H1. В некоторых вариантах осуществления нуклеотидная последовательность, кодирующая гидовую РНК, может быть функционально связана с промотором U6 мыши или человека. В других вариантах осуществления нуклеотидная последовательность, кодирующая гидовую РНК, может быть функционально связана с промотором H1 мыши или человека. В вариантах осуществления с более чем одной гидовой РНК промоторы, используемые для управления экспрессией, могут быть одинаковыми или разными. В некоторых вариантах осуществления нуклеотид, кодирующий сгРНК гидовой РНК, и нуклеотид, кодирующий trРНК гидовой РНК, могут находиться в одном векторе. В некоторых вариантах осуществления нуклеотид, кодирующий сгРНК, и нуклеотид, кодирующий trРНК, могут находиться под управлением одного промотора. В некоторых вариантах осуществления сгРНК и trРНК могут транскрибироваться в один транскрипт. Например, сгРНК и trРНК могут процессироваться из одного транскрипта с образованием гидовой РНК из двух молекул. В альтернативном варианте сгРНК и trРНК могут транскрибироваться в гидовую РНК из одной молекулы (огРНК). В других вариантах осуществления сгРНК и trРНК могут находиться под управлением соответствующих промоторов в одном векторе. В других вариантах осуществления сгРНК и trРНК могут кодироваться разными векторами.

В некоторых вариантах осуществления нуклеотидная последовательность, кодирующая гидовую РНК (гРНК альбумина; и/или гРНК SERPINA1), может быть расположена в том же векторе, который содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, такой как белок Cas. В некоторых вариантах осуществления одна или более гРНК альбумина и/или одна или более гРНК SERPINA1 могут быть расположены в одном векторе. В некоторых вариантах осуществления одна или более гРНК альбумина и/или одна или более гРНК SERPINA1 могут быть расположены в одном векторе с нуклеотидной последовательностью, кодирующей РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, такой как белок Cas. В некоторых вариантах осуществления экспрессия гидовой РНК и РНК-направляемого ДНК-связывающего агента, такого как белок Cas, может находиться под управлением их собственных соответствующих промоторов. В некоторых вариантах осуществления экспрессия гидовой РНК может находиться под управлением того же промотора, который управляет экспрессией РНК-направляемого ДНК-связывающего агента, такого как белок Cas. В некоторых вариантах осуществления гидовая РНК и транскрипт РНК-направляемого ДНК-связывающего агента, такого как белок Cas, могут содержаться в рамках одного транскрипта. Например, гидовая РНК может находиться в нетранслируемой области (НТО) РНК-направляемого ДНК-связывающего агента, такого как транскрипт белка Cas. В некоторых вариантах осуществления гидовая РНК может находиться в 5' НТО транскрипта. В других вариантах осуществления гидовая РНК может находиться в 3' НТО транскрипта. В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный период полужизни транскрипта может быть уменьшен за счет содержания гидовой РНК в 3' НТО и, таким образом, сокращения длины 3' НТО. В дополнительных вариантах осуществления гидовая РНК может находиться в интроне транскрипта. В некоторых вариантах осуществления подходящие сайты сплайсинга можно добавлять к интрону, в котором расположена гидовая РНК, чтобы обеспечить правильный сплайсинг гидовой РНК из транскрипта. В некоторых вариантах осуществления экспрессия РНК-направляемого ДНК-связывающего агента, такого как белок Cas, и гидовой РНК из одного вектора в непосредственной временной близости, может способствовать более эффективному образованию комплекса CRISPR RNP.

В некоторых вариантах осуществления нуклеотидная последовательность, кодирующая гидовую РНК (гРНК альбумина; и/или гРНК SERPINA1) и/или РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, может быть расположена в том же векторе, который содержит конструкцию, содержащую гетерологичный ген ААТ. В некоторых вариантах осуществления близость конструкции, содержащей ген ААТ, и гидовой РНК (и/или РНК-направляемого ДНК-связывающего агента) в одном векторе может способствовать более эффективной вставке конструкции в сайт вставки, созданный гидовой РНК/РНК-направляемым ДНК-связывающим агентом.

В некоторых вариантах осуществления вектор содержит одну или более нуклеотидных последовательностей, кодирующих оРНК (гРНК альбумина; и/или гРНК SERPINA1) и мРНК, кодирующие РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, который

может представлять собой белок Cas, такой как Cas9 или Cpf1. В некоторых вариантах осуществления вектор содержит одну или более нуклеотидных последовательностей, кодирующих sgRNA, trRNA и mRNA, кодирующие РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, который может представлять собой белок Cas, такой как Cas9 или Cpf1. В одном варианте осуществления Cas9 получен из *Streptococcus pyogenes* (т. е. Cas9 Spy). В некоторых вариантах осуществления нуклеотидная последовательность, кодирующая sgRNA, trRNA или sgRNA и trRNA (которая может представлять собой ogRNA), содержит или состоит из направляющей последовательности, фланкируемой всей или частью повторяющейся последовательности из CRISPR/Cas природного происхождения. Нуклеиновая кислота, содержащая sgRNA, trRNA или sgRNA и trRNA или состоящая из них, может дополнительно содержать векторную последовательность, причем векторная последовательность содержит или состоит из нуклеиновых кислот, которые в природе не встречаются вместе с sgRNA, trRNA или sgRNA и trRNA.

В некоторых вариантах осуществления sgRNA и trRNA кодируются не непрерывными нуклеиновыми кислотами в одном векторе. В других вариантах осуществления sgRNA и trRNA могут кодироваться непрерывной нуклеиновой кислотой. В некоторых вариантах осуществления sgRNA и trRNA кодируются противоположными цепями одной нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления sgRNA и trRNA кодируются одной цепью одной нуклеиновой кислоты.

В некоторых вариантах осуществления вектор содержит донорную конструкцию (например, двунаправленную конструкцию нуклеиновой кислоты), содержащую последовательность, кодирующую гетерологичный ААТ, как описано в данном документе. В некоторых вариантах осуществления, в дополнение к описанной в данном документе донорной конструкции (например, двунаправленной конструкции нуклеиновой кислоты) вектор может дополнительно содержать нуклеиновые кислоты, которые кодируют описанные в данном документе гидовые РНК альбумина, и/или нуклеиновую кислоту, кодирующую РНК-направляемый ДНК-связывающий агент (например, Cas-нуклеазу, такую как Cas9). В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота, кодирующая гидовую РНК альбумина, и/или нуклеиновая кислота, кодирующая РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, каждая или обе, находятся в отдельном векторе, отличном от вектора, который содержит описанную в данном документе донорную конструкцию (например, двунаправленную конструкцию). В любом из вариантов осуществления вектор может содержать другие последовательности, которые включают, но не ограничиваются этим, промоторы, энхансеры, регуляторные последовательности, как описано в данном документе. В некоторых вариантах осуществления промотор не управляет экспрессией гетерологичного ААТ донорной конструкции (например, двунаправленной конструкции). В некоторых вариантах осуществления вектор содержит одну или более нуклеотидных последовательностей, кодирующих sgRNA, trRNA или sgRNA и trRNA. В некоторых вариантах осуществления вектор содержит одну или более нуклеотидных последовательностей, кодирующих ogRNA и mRNA, кодирующие РНК-

направляемую ДНК-нуклеазу, которая может представлять собой Cas-нуклеазу (например, Cas9). В некоторых вариантах осуществления вектор содержит одну или более нуклеотидных последовательностей, кодирующих crРНК, trРНК и mРНК, кодирующие РНК-направляемую ДНК-нуклеазу, которая может представлять собой Cas-нуклеазу, такую как Cas9. В некоторых вариантах осуществления Cas9 получен из *Streptococcus pyogenes* (т. е. Cas9 Spy). В некоторых вариантах осуществления нуклеотидная последовательность, кодирующая crРНК, trРНК или crРНК и trРНК (которая может представлять собой ogРНК), содержит или состоит из направляющей последовательности, фланкируемой всей или частью повторяющейся последовательности из CRISPR/Cas природного происхождения. Нуклеиновая кислота, содержащая crРНК, trРНК или crРНК и trРНК или состоящая из них, может дополнительно содержать векторную последовательность, причем векторная последовательность содержит или состоит из нуклеиновых кислот, которые в природе не встречаются вместе с crРНК, trРНК или crРНК и trРНК.

В некоторых вариантах осуществления вектор может быть кольцевым. В других вариантах осуществления вектор может быть линейным. В некоторых вариантах осуществления вектор может быть заключен в липидную наночастицу, липосому, нелипидную наночастицу или вирусный капсид. Неограничивающие типовые векторы включают плазмиды, фагмиды, космиды, искусственные хромосомы, минихромосомы, транспозоны, вирусные векторы и экспрессионные векторы.

В некоторых вариантах осуществления вектор может представлять собой вирусный вектор. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор может быть генетически модифицирован по сравнению с его аналогом дикого типа. Например, вирусный вектор может содержать вставку, делецию или замену одного или более нуклеотидов для облегчения клонирования или для изменения одного или более свойств вектора. Такие свойства могут включать паковую способность, эффективность трансдукции, иммуногенность, интеграцию в геном, репликацию, транскрипцию и трансляцию. В некоторых вариантах осуществления часть вирусного генома может быть удалена, чтобы вирус был способен паковать экзогенные последовательности большего размера. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор может иметь повышенную эффективность трансдукции. В некоторых вариантах осуществления иммунный ответ, индуцированный вирусом у хозяина, может быть снижен. В некоторых вариантах осуществления вирусные гены (такие как, например, интеграза), которые способствуют интеграции вирусной последовательности в геном хозяина, могут быть мутированы так, чтобы вирус становится неинтегрирующимся. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор может быть дефективным по репликации. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор может содержать экзогенные последовательности управления транскрипцией или трансляцией для управления экспрессией кодирующих последовательностей в векторе. В некоторых вариантах осуществления вирус может быть хелпер-зависимым. Например, вирусу могут быть необходимы один или более хелперных

вирусов для доставки вирусных компонентов (таких как, например, вирусные белки), необходимых для амплификации и упаковки векторов в вирусные частицы. В таком случае в клетку-хозяина вместе с описанной в данном документе векторной системой можно вносить один или более хелперных компонентов, включая один или более векторов, кодирующих вирусные компоненты. В других вариантах осуществления вирус может быть хелпер-независимым. Например, вирус может быть способен амплифицировать и упаковать векторы без хелперного вируса. В некоторых вариантах осуществления описанная в данном документе векторная система может также кодировать вирусные компоненты, необходимые для амплификации и упаковки вируса.

Неограничивающие типовые вирусные векторы включают вектор на основе аденоассоциированного вируса (AAV), лентивирусные векторы, аденовирусные векторы, хелпер-зависимые аденовирусные векторы (HDAd), векторы на основе вируса простого герпеса (HSV-1), бактериофаг T4, бакуловирусные векторы и ретровирусные векторы. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор может представлять собой AAV-вектор. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор может представлять собой лентивирусный вектор.

В некоторых вариантах осуществления «AAV» относится ко всем серотипам, подтипам и встречающимся в природе AAV, а также к рекомбинантному AAV. Аббревиатуру «AAV» можно использовать для обозначения самого вируса или его производного. Термин «AAV» включает AAV1, AAV2, AAV3, AAV3B, AAV4, AAV5, AAV6, AAV6.2, AAV7, AAVrh.64R1, AAVhu.37, AAVrh.8, AAVrh.32.33, AAV8, AAV9, AAV-DJ, AAV2/8, AAVrh10, AAVLK03, AV10, AAV11, AAV12, rh10 и их гибриды, AAV птиц, AAV бычьих, AAV собачьих, AAV лошадиных, AAV приматов, AAV отличных от приматов животных и AAV овечьих. Геномные последовательности различных серотипов AAV, а также последовательности нативных концевых повторов (КП), Rep-белков и субъединиц капсида известны в данной области техники. Такие последовательности можно найти в литературе или в общедоступных базах данных, таких как GenBank. В контексте данного документа термин «AAV-вектор» относится к AAV-вектору, содержащему гетерологичную последовательность с происхождением, отличным от AAV (т. е. последовательность нуклеиновой кислоты, гетерологичную для AAV), обычно содержащую последовательность, кодирующую представляющий интерес гетерологичный полипептид (например, ААТ). Конструкция может содержать капсидную последовательность AAV1, AAV2, AAV3, AAV3B, AAV4, AAV5, AAV6, AAV6.2, AAV7, AAVrh.64R1, AAVhu.37, AAVrh.8, AAVrh.32.33, AAV8, AAV9, AAV-DJ, AAV2/8, AAVrh10, AAVLK03, AV10, AAV11, AAV12, rh10 и их гибридов, AAV птиц, AAV бычьих, AAV собачьих, AAV лошадиных, AAV приматов, AAV отличных от приматов животных и AAV овечьих. В общем случае последовательность гетерологичной нуклеиновой кислоты (трансген) фланкируется по меньшей мере одной, по меньшей мере двумя или по меньшей мере тремя последовательностями инвертированных концевых повторов AAV (ИКП). AAV-вектор может быть одноцепочечным (ssAAV) или

самокомплементарным (scAAV).

В некоторых вариантах осуществления лентивирус может быть неинтегрирующимся. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор может представлять собой аденовирусный вектор. В некоторых вариантах осуществления аденовирус может представлять собой аденовирус с высокой клонирующей способностью или аденовирус «без внутренностей», в котором удалены все кодирующие вирусные области, кроме 5' и 3' инвертированных концевых повторов (ИКП) и сигнала упаковки (Г), чтобы увеличить его пакующую способность. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор может представлять собой вектор HSV-1. В некоторых вариантах осуществления вектор на основе HSV-1 является хелпер-зависимым, а в других вариантах он является хелпер-независимым. Например, для ампликонного вектора, в котором сохранена только последовательность упаковки, необходим хелперный вирус со структурными компонентами для упаковки, тогда как для вектора HSV-1 с удалением 30 т. п. о., что устраняет второстепенные вирусные функции, нет необходимости в хелперном вирусе. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор может представлять собой бактериофаг T4. В некоторых вариантах осуществления бактериофаг T4 может быть способен упаковывать любые линейные или кольцевые молекулы ДНК или РНК при опустошении головки вируса. В дополнительных вариантах осуществления вирусный вектор может представлять собой бакуловирусный вектор. В дополнительных вариантах осуществления вирусный вектор может представлять собой ретровирусный вектор. В вариантах осуществления с использованием AAV или лентивирусных векторов, которые обладают меньшей клонирующей способностью, может быть необходимо использовать более одного вектора для доставки всех компонентов векторной системы, как описано в данном документе. Например, один AAV-вектор может содержать последовательности, кодирующие РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, такой как белок Cas (например, Cas9), тогда как второй AAV-вектор может содержать одну или более направляющих последовательностей.

В некоторых вариантах осуществления векторная система может быть способна управлять экспрессией одной или более кодирующих последовательностей в клетке. В некоторых вариантах осуществления вектор не содержит промотор, который управляет экспрессией одной или более кодирующих последовательностей после интеграции в клетку (например, использует эндогенный промотор клетки-хозяина, например, как при вставке в интрон 1 локуса альбумина, как проиллюстрировано в данном документе). В некоторых вариантах осуществления клетка может быть прокариотической клеткой, такой как, например, бактериальная клетка. В некоторых вариантах осуществления клетка может быть эукариотической клеткой, такой как, например, клетка дрожжей, растений, насекомых или млекопитающих. В некоторых вариантах осуществления эукариотическая клетка может представлять собой клетку млекопитающего. В некоторых вариантах осуществления эукариотическая клетка может представлять собой клетку грызуна. В некоторых вариантах осуществления эукариотическая клетка может представлять собой

клетку человека. Подходящие промоторы для управления экспрессией в разных типах клеток известны в данной области техники. В некоторых вариантах осуществления промотор может быть дикого типа. В других вариантах осуществления промотор может быть модифицирован для более эффективной или действенной экспрессии. В других вариантах осуществления промотор может быть усечен, но при этом сохранять свою функцию. Например, промотор может иметь нормальный или уменьшенный размер, который подходит для надлежащей упаковки вектора в вирус.

В некоторых вариантах осуществления вектор может содержать нуклеотидную последовательность, кодирующую описанный в данном документе РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, такой как белок Cas (например, Cas9). В некоторых вариантах осуществления нуклеаза, кодируемая вектором, может представлять собой белок Cas. В некоторых вариантах осуществления векторная система может содержать одну копию нуклеотидной последовательности, кодирующей нуклеазу. В других вариантах осуществления векторная система может содержать более одной копии нуклеотидной последовательности, кодирующей нуклеазу. В некоторых вариантах осуществления нуклеотидная последовательность, кодирующая нуклеазу, может быть функционально связана по меньшей мере с одной транскрипционной или трансляционной регуляторной последовательностью. В некоторых вариантах осуществления нуклеотидная последовательность, кодирующая нуклеазу, может быть функционально связана по меньшей мере с одним промотором.

В некоторых вариантах осуществления вектор может содержать любую одну или более конструкций, содержащих описанный в данном документе гетерологичный ген ААТ. В некоторых вариантах осуществления гетерологичный ген ААТ может быть функционально связан по меньшей мере с одной транскрипционной или трансляционной регуляторной последовательностью. В некоторых вариантах осуществления гетерологичный ген ААТ может быть функционально связан по меньшей мере с одним промотором. В некоторых вариантах осуществления гетерологичный ген не связан с промотором, который управляет экспрессией гетерологичного гена.

В некоторых вариантах осуществления промотор может быть конститутивным, индуцибельным или тканеспецифическим. В некоторых вариантах осуществления промотор может представлять собой конститутивный промотор. Неограничивающие типовые конститутивные промоторы включают немедленно ранний промотор цитомегаловируса (CMV), промотор вируса обезьян (SV40), главный поздний промотор аденовируса (MLP), промотор вируса саркомы Рауса (RSV), промотор вируса опухоли молочной железы мышей (MMTV), промотор фосфоглицераткиназы (PGK), промотор фактора элонгации-альфа (EF1a), промоторы убиквитина, промоторы актина, промоторы тубулина, промоторы иммуноглобулина, их функциональный фрагмент или комбинацию любых из вышеперечисленных промоторов. В некоторых вариантах осуществления промотор может представлять собой промотор CMV. В некоторых вариантах осуществления промотор может представлять собой усеченный промотор CMV. В других

вариантах осуществления промотор может представлять собой промотор EF1a. В некоторых вариантах осуществления промотор может представлять собой индуцибельный промотор. Неограничивающие типовые индуцибельные промоторы включают те, которые индуцируются тепловым шоком, светом, химическими веществами, пептидами, металлами, стероидами, антибиотиками или спиртом. В некоторых вариантах осуществления индуцибельный промотор может представлять собой промотор, который имеет низкий базовый (неиндуцированный) уровень экспрессии, такой как, например, промотор Tet-On[®] (Clontech).

В некоторых вариантах осуществления промотор может представлять собой тканеспецифический промотор, например, промотор, специфический в отношении экспрессии в печени.

В некоторых вариантах осуществления композиции содержат векторную систему. В некоторых вариантах осуществления векторная система может содержать один вектор. В других вариантах осуществления векторная система может содержать два вектора. В дополнительных вариантах осуществления векторная система может содержать три вектора. Когда для мультиплексирования используют разные гидовые РНК или когда используют несколько копий гидовой РНК, векторная система может содержать более трех векторов.

В некоторых вариантах осуществления векторная система может содержать индуцибельные промоторы, чтобы экспрессия начиналась только после ее доставки в целевую клетку. Неограничивающие типовые индуцибельные промоторы включают те, которые индуцируются тепловым шоком, светом, химическими веществами, пептидами, металлами, стероидами, антибиотиками или спиртом. В некоторых вариантах осуществления индуцибельный промотор может представлять собой промотор, который имеет низкий базовый (неиндуцированный) уровень экспрессии, такой как, например, промотор Tet-On[®] (Clontech).

В дополнительных вариантах осуществления векторная система может содержать тканеспецифические промоторы, чтобы экспрессия начиналась только после ее доставки в конкретную ткань.

Вектор, содержащий одну или более гидовых РНК (гРНК альбумина; и/или гРНК SERPINA1), РНК-направляемый ДНК-связывающий агент или донорную конструкцию, содержащую последовательность, кодирующую гетерологичный белок ААТ, по отдельности или в любой комбинации, может быть доставлен с помощью липосомы, наночастицы, экзосомы или микровезикулы. Вектор также можно доставлять с помощью липидной наночастицы (ЛНЧ). Одна или более гидовых РНК (гРНК альбумина; и/или гРНК SERPINA1), РНК-направляемый ДНК-связывающий агент (например, мРНК) или донорная конструкция, содержащая последовательность, кодирующую гетерологичный белок ААТ, по отдельности или в любой комбинации, могут быть доставлены с помощью липосомы, наночастицы, экзосомы или микровезикулы. Одна или более гидовых РНК (гРНК альбумина; и/или гРНК SERPINA1), РНК-направляемый ДНК-связывающий агент

(например, мРНК) или донорная конструкция, содержащая последовательность, кодирующую гетерологичный белок ААТ, по отдельности или в любой комбинации, могут быть доставлены с помощью ЛНЧ.

Липидные наночастицы (ЛНЧ) являются хорошо известным средством доставки нуклеотидного и белкового груза и могут использоваться для доставки любых из гидовых РНК (например, гРНК альбумина; и/или гРНК SERPINA1), РНК-направляемого ДНК-связывающего агента и/или донорной конструкции (например, двунаправленной конструкции), описанных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления ЛНЧ доставляют композиции в форме нуклеиновой кислоты (например, ДНК или мРНК), или белка (например, Cas-нуклеазы), или нуклеиновой кислоты вместе с белком, в зависимости от ситуации.

В некоторых вариантах осуществления в данном документе предложен способ доставки любой из описанных в данном документе гидовых РНК (гРНК альбумина; и/или гРНК SERPINA1) и/или описанной в данном документе донорной конструкции (например, двунаправленной конструкции), отдельно или в комбинации, в клетку-хозяина или в организм субъекта, причем любые один или более компонентов связаны с ЛНЧ. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает применение РНК-направляемого ДНК-связывающего агента (например, Cas9 или последовательности, кодирующей Cas9).

В некоторых вариантах осуществления в данном документе предложена композиция, содержащая любую из описанных в данном документе гидовых РНК (гРНК альбумина; и/или гРНК SERPINA1) и/или описанную в данном документе донорную конструкцию (например, двунаправленную конструкцию), отдельно или в комбинации с ЛНЧ. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает применение РНК-направляемого ДНК-связывающего агента (например, Cas9 или последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей Cas9).

В некоторых вариантах осуществления ЛНЧ содержат биоразлагаемые ионизируемые липиды. В некоторых вариантах осуществления ЛНЧ содержат (9Z,12Z)-3-((4,4-бис(октилокси)бутаноил)окси)-2-(((3-(диэтиламино)пропокси)карбонил)окси)метил)пропил(9Z,12Z)-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-диеноатом), или другой ионизируемый липид. Смотрите, например, липиды из PCT/US2018/053559 (поданной 28 сентября, 2018 г.), WO/2017/173054, WO2015/095340 и WO2014/136086, а также ссылки, приведенные в них. В некоторых вариантах осуществления термины «катионный» и «ионизируемый» в контексте ЛНЧ-липидов являются взаимозаменяемыми, например, когда ионизируемые липиды являются катионными в зависимости от pH.

В некоторых вариантах осуществления ЛНЧ, связанные с двунаправленной конструкцией, описанной в данном документе, используют при изготовлении лекарственного средства для лечения заболевания или нарушения. Заболевание или

нарушение может представлять собой заболевание, связанное с дефицитом α 1-антитрипсина (AATD).

В некоторых вариантах осуществления любые из описанных в данном документе гидовых РНК, описанных в данном документе РНК-направляемых ДНК-связывающих агентов и/или описанных в данном документе донорных конструкций (например, двунаправленных конструкций), отдельно или в комбинации, оголенные или как часть вектора, составляют или вводят с помощью липидной наночастицы; смотрите, например, WO/2017/173054, содержание которой в полном объеме включено в данный документ посредством ссылки.

Будет очевидно, что описанные в данном документе одна или более гидовых РНК (гРНК альбумина; и/или гРНК SERPINA1), РНК-направляемый ДНК-связывающий агент (например, Cas-нуклеаза или нуклеиновая кислота, кодирующая Cas-нуклеазу) и донорная конструкция (например, двунаправленная конструкция), содержащая последовательность, кодирующую гетерологичный ААТ, могут быть доставлены с использованием одной или разных систем. Например, гидовую РНК, РНК-направляемый ДНК-связывающий агент (например, Cas-нуклеазу) и конструкцию может нести один вектор (например, AAV). В альтернативном варианте РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, такой как Cas-нуклеазу (в виде белка или мРНК) и/или гРНК (гРНК альбумина; и/или гРНК SERPINA1) могут нести плазида или ЛНЧ, тогда как донорную конструкцию может нести вектор, такой как AAV. Применение любой из ряда комбинаций будет основано, например, на практичности и эффективности их применения. Кроме того, разные системы доставки можно вводить одним и тем же или разными путями (например, путем инфузии; путем инъекции, например, внутримышечной инъекции, инъекции в хвостовую вену или другой внутривенной инъекции; путем внутрибрюшинного введения и/или внутримышечной инъекции).

Разные системы доставки можно доставлять *in vitro* или *in vivo* одновременно или в любом последовательном порядке. В некоторых вариантах осуществления донорную конструкцию, гидовую РНК (гРНК альбумина; и/или гРНК SERPINA1) и Cas-нуклеазу можно доставлять *in vitro* или *in vivo* одновременно, например, в одном векторе, двух векторах, трех векторах, отдельных векторах, одной ЛНЧ, двух ЛНЧ, трех ЛНЧ, отдельных ЛНЧ или их комбинации. В некоторых вариантах осуществления донорную конструкцию можно доставлять *in vivo* или *in vitro* в виде вектора и/или связанной с ЛНЧ до (например, за около 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или более суток) доставки гидовой РНК альбумина и/или Cas-нуклеазы в виде вектора и/или связанных с ЛНЧ, по отдельности или вместе в виде рибонуклеопротеина (РНП). В некоторых вариантах осуществления донорную конструкцию можно доставлять многократно, например, каждые сутки, каждые двое суток, каждые трое суток, каждые четверо суток, каждую неделю, каждые две недели, каждые три недели или каждые четыре недели. В некоторых вариантах осуществления донорную конструкцию можно доставлять с однонедельными интервалами, например, на 1 неделе, 2 неделе и 3 неделе и т. д. В качестве

дополнительного примера, гидовую РНК альбумина и Cas-нуклеазу, в виде вектора и/или связанные с ЛНЧ, по отдельности или вместе в виде рибонуклеопротеина (РНП), можно доставлять *in vivo* или *in vitro* до (например, за около 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или более суток) доставки конструкции в виде вектора и/или связанной с ЛНЧ. В некоторых вариантах осуществления гидовую РНК альбумина можно доставлять многократно, например, каждые сутки, каждые двое суток, каждые трое суток, каждые четверо суток, каждую неделю, каждые две недели, каждые три недели или каждые четыре недели. В некоторых вариантах осуществления гидовую РНК альбумина можно доставлять с однонедельными интервалами, например, на 1 неделе, 2 неделе и 3 неделе и т. д. В некоторых вариантах осуществления Cas-нуклеазу можно доставлять за несколько введений, например, можно доставлять каждые сутки, каждые двое суток, каждые трое суток, каждые четверо суток, каждую неделю, каждые две недели, каждые три недели или каждые четыре недели. В некоторых вариантах осуществления Cas-нуклеазу можно доставлять с интервалами в одну неделю, например, на 1 неделю, 2 неделю, 3 неделю и т. д.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении также предложены фармацевтические составы для введения любой из описанных в данном документе гидовых РНК (гРНК альбумина; и/или гРНК SERPINA1). В некоторых вариантах осуществления фармацевтический состав содержит РНК-направляемый ДНК-связывающий агент (например, Cas-нуклеазу), и донорную конструкцию, содержащую кодирующую последовательность гетерологичного ААТ, как описано в данном документе. Фармацевтические составы, подходящие для доставки субъекту (например, человеку), хорошо известны в данной области техники.

Способы применения

ген, кодирующий ААТ, расположен в хромосоме 14q32.1 и части локуса ингибитора протеазы (Pi). Нормальный ААТ может называться PiM. Мутация PiZ может вызывать печеночные и/или легочные симптомы, включая гомозиготных (ZZ) и гетерозиготных (MZ или SZ) индивидов. Мутация PiS может вызывать меньшее снижение сывороточного ААТ и меньший риск заболевания легких. В данной области техники известны многочисленные аллельные варианты. Смотрите, например, Greulich et al. "Alpha-1-antitrypsin deficiency: increasing awareness and improving diagnosis," *Ther Adv Respir Dis.* 2016.

ААТD можно диагностировать известными в данной области техники способами, например, по наличию одного или более физиологических симптомов, анализам крови и/или генетическим тестам в отношении одной или более из 150+ известных и описанных на сегодня мутаций ААТ. Смотрите, например, *id.* Примеры анализов крови и тестов включают, но не ограничиваются этим, анализ сывороточных уровней ААТ, обнаружение мутаций методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) и/или секвенирования нового поколения (NGS), изоэлектрическое фокусирование (ИЭФ) с иммуноблоттингом или без, секвенирование локуса гена ААТ и карты отделения сыворотки (латеральный проточный

анализ для обнаружения Z-белка).

В некоторых вариантах осуществления сывороточные уровни ААТ могут считаться нормальными в диапазоне 150-350 мг/дл при применении методов иммунодиффузии (которые могут переоценивать сывороточные уровни). В этих вариантах осуществления уровень 80 мг/дл можно считать защитным, например, связанным со сниженным риском появления одного или более симптомов, например, эмфиземы, несмотря на то, что он ниже нормального диапазона.

В некоторых вариантах осуществления сывороточные уровни ААТ могут считаться нормальными в диапазоне 90-200 мг/дл при применении методов нефелометрии или иммунотурбидиметрии и очищенного стандарта. В этих вариантах осуществления уровень 50 мг/дл можно считать защитным, например, связанным со сниженным риском появления одного или более симптомов, например, эмфиземы, несмотря на то, что он ниже нормального диапазона.

В некоторых вариантах осуществления сывороточные уровни ААТ, составляющие менее чем около 130 мг/дл, 125 мг/дл, 120 мг/дл, 115 мг/дл, 110 мг/дл, 105 мг/дл или 100 мг/дл, указывают на низкую вероятность гомозиготной мутации ААТ, и дополнительное генетическое тестирование может быть необязательным. В некоторых вариантах осуществления сывороточные уровни ААТ около 104 мг/дл указывают на низкую вероятность гомозиготной PiS и 113 мг/дл - на низкую вероятность гомозиготной PiZ. В некоторых вариантах осуществления сывороточные уровни ААТ могут обеспечить ограниченную исключительную информацию в отношении гетерозиготных носителей, и необходимо дополнительное генетическое тестирование, поскольку сывороточные уровни ААТ около 150 мг/дл указывают на низкую вероятность гетерозиготного носителя PiMZ, а сывороточные уровни ААТ около 220 мг/дл указывают на низкую вероятность гетерозиготного носителя piMS.

Примеры выявляемых физиологических симптомов включают, но не ограничиваются этим, болезнь легких и/или болезнь печени; свистящее дыхание или одышку; повышенный риск инфекций легких; хроническую обструктивную болезнь легких (ХОБЛ); бронхит, астму, диспноэ; цирроз; желтуху новорожденных; панникулит; хронический кашель и/или выделение слизи; повторяющиеся простуды; пожелтение кожи или белков глаз; вздутие живота или отек ног. В некоторых вариантах осуществления индивиды могут проходить анализы крови и/или генетические тесты, если они являются пациентами с ХОБЛ, невосприимчивыми астматиками, пациентами с бронхоэктазом неизвестной этиологии, индивидами с криптогенным циррозом/болезнью печени, гранулематозом с ангиопатией, некротизирующим панникулитом и/или родственниками первой степени родства пациентов/носителей с ААТD. В некоторых вариантах осуществления могут проводить тестирование функции легких (ТФЛ), функциональной остаточной емкости (ФОЕ) и/или плотности легких при общей емкости легких (ОЕЛ).

В некоторых вариантах осуществления подлежащие лечению субъекты включают индивидов с сывороточным ААТ ниже нормального диапазона. В некоторых вариантах

осуществления подлежащие лечению субъекты включают индивидов с любой комбинацией аллельных мутаций, например, ZZ, MZ, MS. В некоторых вариантах осуществления подлежащие лечению субъекты включают индивидов с FEV1 после бронхорасширяющего средства по меньшей мере 30%, 40%, 50%, 60% от прогнозированного нормального значения. В некоторых вариантах осуществления подлежащие лечению субъекты включают индивидов, допущенных к бронхоскопии. В некоторых вариантах осуществления подлежащие лечению субъекты включают индивидов с нормальной печеночной и почечной функцией, некурящих, индивидов, которые не подвергались лобэктомии легкого или печени, трансплантации, индивидов, которые не проводили операцию по уменьшению объема легких, индивидов, которые не имели острой инфекции дыхательных путей или обострения ХОБЛ непосредственно перед лечением, и/или индивидов, которые не имеют нестабильное легочное сердце.

Как описано в данном документе, в настоящем изобретении предложены композиции и способы для экспрессии гетерологичного ААТ (например, функционального ААТ или ААТ дикого типа) в безопасном приемном сайте человека, таком как безопасный приемный сайт альбумина, для обеспечения экспрессии белка. В некоторых вариантах осуществления способы позволяют ослабить негативные эффекты ААТД в легких. В настоящем изобретении также предложены композиции и способы для нокаута эндогенного гена SERPINA1 с устранением, таким образом, выработки мутантных форм ААТ, связанных с полимеризацией и агрегацией белка ААТ в гепатоцитах печени, что приводит к печеночным симптомам у пациентов с ААТД. Смотрите WO/2018/119182, в полном объеме включенную посредством ссылки. Соответственно, описанные в данном документе композиции и способы позволяют лечить ААТД путем ослабления негативных эффектов нарушения в легких, а также в печени.

ААТ синтезируется и секретируется главным образом гепатоцитами, а его функция состоит в ингибировании активности эластазы нейтрофилов в легких. В отсутствие достаточного количества функционального ААТ эластаза нейтрофилов является неконтролируемой и повреждает альвеолы в легких. Таким образом, мутации в SERPINA1, результатом которых является снижение уровней ААТ или снижение уровней надлежащим образом функционирующего ААТ, приводят к патологии легких, включающей, например, хроническую обструктивную болезнь легких (ХОБЛ), бронхит или астму.

Описанные в данном документе гРНК альбумина, донорная конструкция (например, двунаправленная конструкция, содержащая последовательность, кодирующую функциональный гетерологичный ААТ) и РНК-направляемые ДНК-связывающие агенты, применимы для введения нуклеиновой кислоты гетерологичного ААТ в клетку-хозяина *in vivo* или *in vitro*. В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе гРНК альбумина, донорная конструкция (например, двунаправленная конструкция, содержащая последовательность, кодирующую гетерологичный ААТ) и РНК-направляемые ДНК-связывающие агенты, применимы для экспрессии функционального

гетерологичного ААТ в клетке-хозяине или в организме нуждающегося в этом субъекта. В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе гРНК альбумина, донорная конструкция (например, двунаправленная конструкция, содержащая последовательность, кодирующую гетерологичный ААТ) и РНК-направляемые ДНК-связывающие агенты, применимы для лечения ААТД у нуждающегося в этом субъекта. В некоторых вариантах осуществления лечение ААТД путем экспрессии гетерологичного ААТ в локусе альбумина повышает секрецию функционального (например, дикого типа) ААТ, и смягчает один или более симптомов ААТД, например, негативные эффекты на легкие. Например, экспрессия гетерологичного ААТ может смягчать болезнь легких и/или болезнь печени; свистящее дыхание или одышку; повышенный риск инфекций легких; ХОБЛ; бронхит, астму, диспноэ; цирроз; желтуху новорожденных; панникулит; хронический кашель и/или выделение слизи; повторяющиеся простуды; пожелтение кожи или белков глаз; вздутие живота или отек ног. Введение описанных в данном документе одной или более гРНК альбумина, донорной конструкции (например, двунаправленной конструкции, содержащей последовательность, кодирующую гетерологичный ААТ) и РНК-направляемого ДНК-связывающего агента приводит к повышению экспрессии функционального (например, дикого типа) гена ААТ, уровней белка ААТ (например циркулирующих, сывороточных или плазменных уровней) и/или уровней активности ААТ (например, ингибирования трипсина) (например, большим на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% или 90% генной экспрессии или уровням белка ААТ по сравнению с необработанным контролем, например, по данным нефелометрии или иммунотурбидиметрии, например, ААТ более чем около 40 мг/дл, 45 мг/дл, 50 мг/дл, 60 мг/дл, 70 мг/дл, 80 мг/дл, 90 мг/дл, 100 мг/дл или 110 мг/дл в сыворотке). В некоторых вариантах осуществления эффективность лечения можно оценить путем измерения сывороточной или плазменной активности ААТ, причем повышение сывороточного или плазменного уровня и/или активности ААТ у субъекта указывает на эффективность лечения. В некоторых вариантах осуществления эффективность лечения можно оценить путем измерения сывороточных или плазменных уровней белка ААТ и/или активности, причем повышение сывороточного или плазменного уровня и/или активности ААТ у субъекта указывает на эффективность лечения. В некоторых вариантах осуществления эффективность лечения можно оценивать путем окрашивания PASD срезов ткани печени, например, для измерения агрегации. В некоторых вариантах осуществления эффективность лечения можно оценивать путем определения ингибирования эластазы нейтрофилов, например, в легких. В некоторых вариантах осуществления эффективность лечения можно оценивать по генотипическому сывороточному уровню, легочной функции ААТ, результатам спирометрического исследования, рентгенографии легких, КТ-сканирования легких, анализа крови на печеночную функцию и/или ультразвукового исследования печени.

В некоторых вариантах осуществления лечение относится к повышению сывороточных уровней ААТ, например, до защитных уровней. В некоторых вариантах

осуществления лечение относится к повышению сывороточных уровней ААТ, например, до нормального диапазона. В некоторых вариантах осуществления лечение относится к повышению сывороточных уровней ААТ, например, выше 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100 мг/дл, например, по данным измерений методом нефелометрии или иммунотурбидиметрии и с применением очищенного стандарта.

В некоторых вариантах осуществления лечение относится к повышению сывороточных уровней ААТ, например, до защитных уровней. В некоторых вариантах осуществления лечение относится к повышению сывороточных уровней ААТ, например, до нормального диапазона. В некоторых вариантах осуществления лечение относится к повышению сывороточных уровней ААТ, например, выше 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100 мг/дл, например, по данным измерений методом нефелометрии или иммунотурбидиметрии и с применением очищенного стандарта. В некоторых вариантах осуществления лечение относится к улучшению исходного сывороточного ААТ по сравнению с контролем, например, до и после лечения. В некоторых вариантах осуществления лечение относится к улучшению гистологической градации связанного с ААТД заболевания печени, например, на 1, 2, 3 или более пунктов, по сравнению с контролем, например, до и после лечения. В некоторых вариантах осуществления лечение относится к улучшению оценки фиброза по шкале Исхака по сравнению с контролем, например, до и после лечения.

У нормальных или здоровых индивидов (например, индивидов, которые не имеют аллели ZZ, MZ или SZ) уровни ААТ варьируются от около 500 мкг/мл до около 3000 мкг/мл в сыворотке. Клинически уровень циркулирующего ААТ можно измерить с помощью ферментативного и/или иммунологического анализа (например, ELISA), и эти методы хорошо известны в данной области техники. Смотрите, например, Stoller, J. and Aboussouan, L. (2005) Alpha1-antitrypsin deficiency. *Lancet* 365: 2225-2236; Kanakoudi F, Drossou V, Tzimouli V, et al: Serum concentrations of 10 acute-phase proteins in healthy term and pre-term infants from birth to age 6 months. *Clin Chem* 1995;41:605-608; Morse JO: Alpha-1-antitrypsin deficiency. *N Engl J Med* 1978;299:1045-1048, 1099-1105; Cox DW: Alpha-1-antitrypsin deficiency. In *The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease*. Vol 3. Seventh edition. Edited by CR Scriver, AL Beaudet, WS Sly, D Valle. New York, McGraw-Hill Book Company, 1995, pp 4125-4158.

Соответственно, в некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе композиции и способы применимы для повышения сывороточных или плазменных уровней ААТ (например, функционального ААТ или ААТ дикого типа) у субъекта, имеющего ААТД (например, индивидов, которые имеют аллель ZZ, MZ или SZ) или подверженного риску развития ААТД (например, индивидов, которые имеют аллель ZZ, MZ или SZ), до около 500 мкг/мл или более. В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе композиции и способы применимы для повышения уровней белка ААТ до около 1500 мкг/мл. В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе композиции и способы применимы для повышения

уровней белка ААТ до от около 1000 мкг/мл до около 1500 мкг/мл, от около 1500 мкг/мл до около 2000 мкг/мл, от около 2000 мкг/мл до около 2500 мкг/мл, от около 2500 мкг/мл до около 3000 мкг/мл или более. Например, описанные в данном документе композиции и способы применимы для повышения сывороточных или плазменных уровней ААТ у субъекта, имеющего ААТD, до около 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400, 1500, 1600, 1700, 1800, 1900, 2000, 2100, 2200, 2300, 2400, 2500, 2600, 2700, 2800, 2900, 3000, мкг/мл или более.

В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе композиции и способы применимы для повышения сывороточных или плазменных уровней ААТ у субъекта, имеющего ААТD (например, индивидов, которые имеют аллель ZZ, MZ или SZ) или подверженного риску развития ААТD (например, индивидов, которые имеют аллель ZZ, MZ или SZ), на около 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%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 100%, 110%, 120%, 130%, 140%, 150%, 160%, 170%, 180%, 190%, 200% или более по сравнению с сывороточным или плазменным уровнем ААТ у субъекта до введения.

В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе композиции и способы применимы для повышения количества гетерологичного функционального белка ААТ и/или активности ААТ в клетке-хозяине на около 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%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 100%, 110%, 120%, 130%, 140%, 150%, 160%, 170%, 180%, 190%, 200% или более по сравнению с уровнем ААТ до введения в клетку-хозяина, например, нормальным уровнем. В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой клетку печени.

В некоторых вариантах осуществления клетка (клетка-хозяин) или популяция клеток способна экспрессировать ААТ, например, клетки, которые происходят из ткани одного или более из печени, легкого, органа желудочно-кишечного тракта, почки, желудка, проксимального и дистального участка тонкого кишечника, поджелудочной железы, надпочечников или головного мозга.

В некоторых вариантах осуществления способ включает введение гидовой РНК и РНК-направляемого ДНК-связывающего агента (такого как мРНК, кодирующая Cas9-нуклеазу) в ЛНЧ. В дополнительных вариантах осуществления способ включает введение конструкции нуклеиновой кислоты AAV, кодирующей белок ААТ, такой как двунаправленная конструкция ААТ. CRISPR/Cas9 ЛНЧ, содержащую гидовую РНК и мРНК, кодирующую Cas9, можно вводить внутривенно. Донорную конструкцию AAV ААТ можно вводить внутривенно. Типовое дозирование CRISPR/Cas9 ЛНЧ включает около 0,1, 0,25, 0,3, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8 или 10 мг/кг (РНК). Единицы мг/кг и

миллиграммы на килограмм взаимозаменяемо используют в данном документе. Типовое дозирование AAV, содержащего нуклеиновую кислоту, кодирующую белок ААТ, включает МЗ около 10^{11} , 10^{12} , 10^{13} и 10^{14} вг/кг, необязательно МЗ может составлять от около 1×10^{13} до 1×10^{14} вг/кг.

В некоторых вариантах осуществления способ включает экспрессию терапевтически эффективного количества белка ААТ. В некоторых вариантах осуществления способ включает достижение терапевтически эффективного уровня активности циркулирующего ААТ у индивида. В конкретных вариантах осуществления способ включает достижение активности ААТ по меньшей мере от около 5% до около 50% от нормы. Способ может включать достижение активности ААТ по меньшей мере от около 50% до около 150% от нормы. В определенных вариантах осуществления способ включает достижение повышения активности ААТ по сравнению с исходным уровнем активности ААТ пациента по меньшей мере от около 1% до около 50% от нормальной активности ААТ, или по меньшей мере от около 5% до около 50% от нормальной активности ААТ, или по меньшей мере от около 50% до около 150% от нормальной активности ААТ.

В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает достижение продолжительного эффекта, длящегося, например, по меньшей мере 1 месяц, 2 месяца, 6 месяцев, 1 год или 2 года. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает достижение продолжительного и устойчивого терапевтического эффекта, длящегося, например, по меньшей мере 1 месяц, 2 месяца, 6 месяцев, 1 год или 2 года. В некоторых вариантах осуществления уровень активности и/или уровень циркулирующего ААТ является стабильным в течение по меньшей мере 1 месяца, 2 месяцев, 6 месяцев, 1 года или более. В некоторых вариантах осуществления достижение стабильной активности и/или уровня белка ААТ происходит по меньшей мере через 7 суток, по меньшей мере 14 суток или по меньшей мере 28 суток. В дополнительных вариантах осуществления способ включает поддержание активности и/или уровней ААТ после одной дозы в течение по меньшей мере 1, 2, 4 или 6 месяцев или по меньшей мере 1, 2, 3, 4 или 5 лет.

В дополнительных вариантах осуществления, включающих вставку в локус альбумина, циркулирующие уровни альбумина индивида являются нормальными. Способ может включать поддержание циркулирующих уровней альбумина индивида в пределах $\pm 5\%$, $\pm 10\%$, $\pm 15\%$, $\pm 20\%$ или $\pm 50\%$ от нормальных циркулирующих уровней альбумина. В некоторых вариантах осуществления уровни альбумина у индивида остаются неизменными по сравнению с уровнями альбумина у индивидов, не получающих лечения, по меньшей мере на 4 неделе, 8 неделе, 12 неделе или 20 неделе. В некоторых вариантах осуществления уровни альбумина индивида временно падают, а затем возвращаются к нормальным уровням. В частности, способы могут включать обнаружение отсутствия значительных изменений плазменных уровней альбумина.

В некоторых вариантах осуществления изобретение включает способ или

применение модификации (например, создания двухцепочечного разрыва) гена альбумина, такого как ген альбумина человека, включающие введение или доставку в клетку-хозяина или популяцию клеток-хозяев любых описанных в данном документе одной или более гРНК, донорной конструкции (например, двунаправленной конструкции, содержащей последовательность, кодирующую ААТ) и РНК-направляемых ДНК-связывающих агентов (например, Cas-нуклеазы). В некоторых вариантах осуществления изобретение включает способ или применение модификации (например, создания двухцепочечного разрыва) области интрона 1 альбумина, такого как интрон 1 альбумина человека, включающие введение или доставку в клетку-хозяина или популяцию клеток-хозяев любых описанных в данном документе одной или более гРНК, донорной конструкции (например, двунаправленной конструкции, содержащей последовательность, кодирующую ААТ) и РНК-направляемых ДНК-связывающих агентов (например, Cas-нуклеазы). В некоторых вариантах осуществления изобретение включает способ или применение модификации (например, создания двухцепочечного разрыва) безопасного приемного локуса человека, такого как ткань печени или гепатоцитарная клетка-хозяин, включающие введение или доставку в клетку-хозяина или популяцию клеток-хозяев любых описанных в данном документе одной или более гРНК, донорной конструкции (например, двунаправленной конструкции, содержащей последовательность, кодирующую ААТ) и РНК-направляемых ДНК-связывающих агентов (например, Cas-нуклеазы). Вставка в безопасный приемный локус, такой как локус альбумина, позволяет обеспечивать сверхэкспрессию гена SERPINA1 без существенного вредного воздействия на клетку-хозяина или популяцию клеток, таких как гепатоциты или клетки печени.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложены способ или применение модификации (например, создания двухцепочечного разрыва) интрона 1 локуса альбумина человека, включающие введение или доставку в клетку-хозяина любых описанных в данном документе одной или более гРНК альбумина, донорной конструкции (например, двунаправленной конструкции, содержащей последовательность, кодирующую гетерологичный ААТ) и РНК-направляемых ДНК-связывающих агентов (например, Cas-нуклеазы). В некоторых вариантах осуществления гидовая РНК альбумина содержит направляющую последовательность, которая содержит по меньшей мере 15, 16, 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов, которые способны связываться с областью в пределах интрона 1 локуса альбумина человека (SEQ ID NO: 1). В некоторых вариантах осуществления гидовая РНК альбумина содержит по меньшей мере 15, 16, 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2-33. В некоторых вариантах осуществления гидовая РНК альбумина содержит последовательность, которая по меньшей мере на 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91%, 90%, 89% или 88% идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2-33. В некоторых вариантах осуществления гРНК альбумина содержит направляющую последовательность, содержащую последовательность любой одной из SEQ ID NO: 4, 13, 17, 19, 27, 28, 30 или

31. В некоторых вариантах осуществления введение осуществляют *in vitro*. В некоторых вариантах осуществления введение осуществляют *in vivo*. В некоторых вариантах осуществления донорная конструкция представляет собой двунаправленную конструкцию, которая содержит последовательность, кодирующую гетерологичный ААТ. В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин представляет собой клетку печени.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложены способ или применение внесения нуклеиновой кислоты гетерологичного ААТ (например, функционального ААТ или ААТ дикого типа) в клетку-хозяина, включающие введение или доставку описанных в данном документе одной или более гРНК альбумина, донорной конструкции (например, двунаправленной конструкции, содержащей последовательность, кодирующую гетерологичный ААТ) и РНК-направляемых ДНК-связывающих агентов (например, Cas-нуклеазы). В некоторых вариантах осуществления гРНК альбумина содержит направляющую последовательность, которая содержит по меньшей мере 15, 16, 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов, которые способны связываться с областью в пределах интрона 1 локуса альбумина человека (SEQ ID NO: 1). В некоторых вариантах осуществления гидовая РНК альбумина содержит по меньшей мере 15, 16, 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2-33. В некоторых вариантах осуществления гидовая РНК альбумина содержит последовательность, которая по меньшей мере на 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91%, 90%, 89% или 88% идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2-33. В некоторых вариантах осуществления гРНК альбумина содержит направляющую последовательность, содержащую последовательность любой одной из SEQ ID NO: 4, 13, 17, 19, 27, 28, 30 или 31. В некоторых вариантах осуществления гРНК альбумина содержит последовательность, выбранную из а) последовательности, которая по меньшей мере на 95%, 90%, 85%, 80% или 75% идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 8, 13, 19, 28, 29, 31, 32 или 33; б) по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 8, 13, 19, 28, 29, 31, 32 или 33; в) последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 34, 40, 45, 51, 60, 61, 63, 64, 65, 66, 72, 77, 83, 92, 93, 95, 96 или 97; д) последовательности, которая по меньшей мере на 95%, 90%, 85%, 80% или 75% идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2-33; е) по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2-33; ф) последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 34-97; и г) последовательности, комплементарной 15 последовательным нуклеотидам +/- 10 нуклеотидам геномных координат, приведенных для SEQ ID NO: 2-33. В некоторых вариантах осуществления введение осуществляют *in vitro*. В некоторых вариантах осуществления введение осуществляют *in vivo*. В некоторых вариантах осуществления донорная конструкция представляет собой двунаправленную конструкцию, которая содержит последовательность, кодирующую гетерологичный ААТ

(например, функциональный ААТ или ААТ дикого типа). В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин представляет собой клетку печени.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложены способ или применение экспрессии гетерологичного ААТ (например, функционального ААТ или ААТ дикого типа) в клетке-хозяине, включающие введение или доставку описанных в данном документе одной или более гРНК альбумина, донорной конструкции (например, двунаправленной конструкции, содержащей последовательность, кодирующую гетерологичный ААТ) и РНК-направляемых ДНК-связывающих агентов (например, Cas-нуклеазы). В некоторых вариантах осуществления возраст нуждающегося субъекта составляет от момента рождения и до 2 лет; от 2 до 12 лет; или от 12 до 21 года. В некоторых вариантах осуществления гРНК альбумина содержит направляющую последовательность, которая содержит по меньшей мере 15, 16, 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов, которые способны связываться с областью в пределах интрона 1 локуса альбумина человека (SEQ ID NO: 1). В некоторых вариантах осуществления гРНК альбумина содержит по меньшей мере 15, 16, 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2-33. В некоторых вариантах осуществления гРНК альбумина содержит последовательность, которая по меньшей мере на 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91%, 90%, 89% или 88% идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2-33. В некоторых вариантах осуществления гРНК альбумина содержит направляющую последовательность, содержащую последовательность любой одной из SEQ ID NO: 4, 13, 17, 19, 27, 28, 30 или 31. В некоторых вариантах осуществления гРНК альбумина содержит последовательность, выбранную из а) последовательности, которая по меньшей мере на 95%, 90%, 85%, 80% или 75% идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 8, 13, 19, 28, 29, 31, 32 или 33; б) по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 8, 13, 19, 28, 29, 31, 32 или 33; в) последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 34, 40, 45, 51, 60, 61, 63, 64, 65, 66, 72, 77, 83, 92, 93, 95, 96 или 97; д) последовательности, которая по меньшей мере на 95%, 90%, 85%, 80% или 75% идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2-33; е) по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2-33; ф) последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 34-97; и г) последовательности, комплементарной 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25 последовательным нуклеотидам в пределах геномных координат или охватывающих геномные координаты, приведенные для SEQ ID NO: 2-33. В некоторых вариантах осуществления введение осуществляют *in vitro*. В некоторых вариантах осуществления введение осуществляют *in vivo*. В некоторых вариантах осуществления донорная конструкция представляет собой двунаправленную конструкцию, которая содержит последовательность, кодирующую гетерологичный ААТ. В некоторых

вариантах осуществления клетка-хозяин представляет собой клетку печени.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложены способ или применение лечения ААТД, включающие введение или доставку любых описанных в данном документе одной или более гРНК альбумина, донорной конструкции (например, двунаправленной конструкции, содержащей последовательность, кодирующую гетерологичный ААТ) и РНК-направляемых ДНК-связывающих агентов (например, Cas-нуклеазы) нуждающемуся в этом субъекту. В некоторых вариантах осуществления гРНК альбумина содержит направляющую последовательность, которая содержит по меньшей мере 15, 16, 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов, которые способны связываться с областью в пределах интрона 1 локуса альбумина мыши или человека (SEQ ID NO: 1). В некоторых вариантах осуществления гРНК альбумина содержит по меньшей мере 15, 16, 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2-33. В некоторых вариантах осуществления гРНК альбумина содержит последовательность, которая по меньшей мере на 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91%, 90%, 89% или 88% идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2-33. В некоторых вариантах осуществления гРНК альбумина содержит направляющую последовательность, содержащую последовательность любой одной из SEQ ID NO: 4, 13, 17, 19, 27, 28, 30 или 31. В некоторых вариантах осуществления гРНК альбумина содержит последовательность, выбранную из а) последовательности, которая по меньшей мере на 95%, 90%, 85%, 80% или 75% идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 8, 13, 19, 28, 29, 31, 32, 33; б) по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 8, 13, 19, 28, 29, 31, 32, 33; в) последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 34, 40, 45, 51, 60, 61, 63, 64, 65, 66, 72, 77, 83, 92, 93, 95, 96 и 97; д) последовательности, которая по меньшей мере на 95%, 90%, 85%, 80% или 75% идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2-33; е) по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2-33; ф) последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 34-97; и г) последовательности, комплементарной 15 последовательным нуклеотидам +/- 10 нуклеотидам геномных координат, приведенных для SEQ ID NO: 2-33. В некоторых вариантах осуществления донорная конструкция представляет собой двунаправленную конструкцию, которая содержит последовательность, кодирующую гетерологичный ААТ. В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин представляет собой клетку печени.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложены способ или применение повышения секреции функционального ААТ из клетки печени, включающие введение или доставку описанных в данном документе одной или более гРНК альбумина, донорной конструкции (например, двунаправленной конструкции, содержащей последовательность, кодирующую гетерологичный ААТ) и РНК-

направляемых ДНК-связывающих агентов (например, Cas-нуклеазы). В некоторых вариантах осуществления гРНК альбумина содержит направляющую последовательность, которая содержит по меньшей мере 15, 16, 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов, которые способны связываться с областью в пределах интрона 1 локуса альбумина мыши или человека (SEQ ID NO: 1). В некоторых вариантах осуществления гРНК альбумина содержит по меньшей мере 15, 16, 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2-33. В некоторых вариантах осуществления гРНК альбумина содержит последовательность, которая по меньшей мере на 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91%, 90%, 89% или 88% идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2-33. В некоторых вариантах осуществления гРНК альбумина содержит направляющую последовательность, содержащую последовательность любой одной из SEQ ID NO: 4, 13, 17, 19, 27, 28, 30 или 31. В некоторых вариантах осуществления введение осуществляют *in vitro*. В некоторых вариантах осуществления введение осуществляют *in vivo*. В некоторых вариантах осуществления донорная конструкция представляет собой двунаправленную конструкцию, которая содержит последовательность, кодирующую гетерологичный ААТ. В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин представляет собой клетку печени.

Как описано в данном документе, донорную конструкцию (например, двунаправленную конструкцию), содержащую последовательность, кодирующую гетерологичный ААТ, гРНК альбумина и РНК-направляемый ДНК-связывающий агент можно доставлять с помощью любых подходящих системы доставки и способа, известных в данной области техники. Композиции можно доставлять *in vitro* или *in vivo* одновременно или в любом последовательном порядке. В некоторых вариантах осуществления донорную конструкцию, гРНК альбумина и Cas-нуклеазу можно доставлять *in vitro* или *in vivo* одновременно, например, в одном векторе, двух векторах, отдельных векторах, одной ЛНЧ, двух ЛНЧ, отдельных ЛНЧ или их комбинации. В некоторых вариантах осуществления донорную конструкцию можно доставлять *in vivo* или *in vitro* в виде вектора и/или связанной с ЛНЧ до (например, за около 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или более суток) доставки гРНК альбумина и/или Cas-нуклеазы в виде вектора и/или связанных с ЛНЧ, по отдельности или вместе в виде рибонуклеопротеина (РНП). В качестве дополнительного примера, гидовую РНК и Cas-нуклеазу в виде вектора и/или связанные с ЛНЧ, по отдельности или вместе в виде рибонуклеопротеина (РНП), можно доставлять *in vivo* или *in vitro* до (например, за около 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или более суток) доставки конструкции в виде вектора и/или связанной с ЛНЧ. В некоторых вариантах осуществления гидовая РНК и Cas-нуклеаза связаны с ЛНЧ и доставляются в клетку-хозяина до доставки донорной конструкции.

В некоторых вариантах осуществления донорная конструкция содержит последовательность, кодирующую гетерологичный ААТ, причем последовательность ААТ представляет собой ААТ дикого типа, например, SEQ ID NO: 700 или 702. В

некоторых вариантах осуществления последовательность кодирует функциональный вариант ААТ. Например, вариант обладает повышенной активностью ингибирования трипсина, чем ААТ дикого типа. В некоторых вариантах осуществления последовательность кодирует вариант ААТ, который на 80%, 85%, 90%, 93%, 95%, 97%, 99% идентичен SEQ ID NO: 702, имеющей по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 92%, 94%, 96%, 98%, 99%, 100% или более активности по сравнению с ААТ дикого типа. В некоторых вариантах осуществления последовательность кодирует функциональный фрагмент ААТ, причем фрагмент обладает по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 92%, 94%, 96%, 98%, 99%, 100% или более активности по сравнению с ААТ дикого типа.

В некоторых вариантах осуществления донорную конструкцию (например, двунаправленную конструкцию) вводят в векторе нуклеиновой кислоты, таком как AAV-вектор, например, AAV8. В некоторых вариантах осуществления донорная конструкция не содержит плечо гомологии.

В некоторых вариантах осуществления субъект представляет собой млекопитающее. В некоторых вариантах осуществления субъект представляет собой человека. В некоторых вариантах осуществления субъектом является корова, свинья, обезьяна, овца, собака, кошка, рыба или домашняя птица.

В некоторых вариантах осуществления донорную конструкцию (например, двунаправленную конструкцию), содержащую последовательность, кодирующую гетерологичный ААТ, гРНК альбумина и РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, вводят внутривенно. В некоторых вариантах осуществления донорную конструкцию (например, двунаправленную конструкцию), содержащую последовательность, кодирующую гетерологичный ААТ, гРНК альбумина и РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, вводят в печеночную циркуляцию.

В некоторых вариантах осуществления одного введения донорной конструкции (например, двунаправленной конструкции), содержащей последовательность, кодирующую гетерологичный ААТ, гРНК альбумина и РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, достаточно для повышения экспрессии и секреции ААТ до необходимого уровня. В других вариантах осуществления может быть необходимо более одного введения композиции, содержащей донорную конструкцию (например, двунаправленную конструкцию), содержащую последовательность, кодирующую гетерологичный ААТ, гРНК альбумина и РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, для максимизации терапевтических эффектов.

В некоторых вариантах осуществления используют многократное введение донорной конструкции (например, двунаправленной конструкции), содержащей последовательность, кодирующую гетерологичный ААТ, гРНК альбумина и РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, для повышения экспрессии и секреции ААТ до необходимого уровня и/или максимизации редактирования за счет кумулятивного эффекта. В некоторых вариантах осуществления используют многократное введение гидовой РНК альбумина для повышения экспрессии и секреции ААТ до необходимого

уровня и/или максимизации редактирования за счет кумулятивного эффекта. В некоторых вариантах осуществления используют многократное введение Cas-нуклеазы для повышения экспрессии и секреции ААТ до необходимого уровня и/или максимизации редактирования за счет кумулятивного эффекта. В некоторых вариантах осуществления донорную конструкцию, гидовую РНК альбумина и/или Cas-нуклеазу можно доставлять каждые сутки, каждые двое суток, каждые трое суток, каждые четверо суток, каждую неделю, каждые две недели, каждые три недели или каждые четыре недели. В некоторых вариантах осуществления способ лечения ААТД дополнительно включает введение гидовой РНК SERPINA1, содержащей одну или более направляющих последовательностей SEQ ID NO: 1000-1128. В некоторых вариантах осуществления гРНК SERPINA1, содержащую одну или более направляющих последовательностей SEQ ID NO: 1000-1128, вводят для лечения ААТД. Гидовую РНК SERPINA1 можно вводить вместе с белком Cas или мРНК или вектором, кодирующими белок Cas, такой как, например, Cas9.

В некоторых вариантах осуществления предложен способ лечения ААТД, включающий снижение или предотвращение накопления ААТ (например, мутантного нефункционального ААТ) в сыворотке, печени, ткани печени, клетках печени и/или гепатоцитах субъекта, включающий введение гидовой РНК SERPINA1, содержащей одну или более направляющих последовательностей SEQ ID NO: 1000-1128. В некоторых вариантах осуществления гРНК SERPINA1, содержащую одну или более направляющих последовательностей SEQ ID NO: 1000-1128, вводят для снижения или предотвращения накопления ААТ (например, мутантного нефункционального ААТ) в печени, ткани печени, клетках печени и/или гепатоцитах. гРНК можно вводить вместе с РНК-направляемым ДНК-связывающим агентом, таким как белок Cas, или мРНК или вектором, кодирующими белок Cas, такой как, например, Cas9.

В некоторых вариантах осуществления гРНК SERPINA1, содержащие направляющие последовательности из таблицы 3, вместе с белком Cas индуцируют ДЦР, а негомологичное соединение концов (НГСК) во время репарации приводит к мутации в гене SERPINA1. В некоторых вариантах осуществления НГСК приводит к удалению или вставке нуклеотида(ов), что индуцирует сдвиг рамки или нонсенс-мутацию в гене SERPINA1. В некоторых вариантах осуществления гРНК SERPINA1, содержащие направляющие последовательности из таблицы 2, вместе с белком Cas индуцируют ДЦР, а репарация путем НГСК опосредует вставку конструкции матричной нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления вставка матричной нуклеиновой кислоты повышает уровни секретируемого белка ААТ. В некоторых вариантах осуществления вставка матричной нуклеиновой кислоты повышает уровни секретируемого гетерологичного белка ААТ. В некоторых вариантах осуществления вставка матричной нуклеиновой кислоты повышает уровни белка ААТ в крови, сыворотке и/или плазме.

В некоторых вариантах осуществления введение описанных в данном документе гидовых РНК SERPINA1 снижает уровни мутированного альфа-1-антитрипсина (ААТ), вырабатываемого субъектом, и, следовательно, предотвращает накопление и агрегацию

ААТ в печени.

В некоторых вариантах осуществления одного введения описанной в данном документе гидовой РНК SERPINA1 достаточно для нокдауна экспрессии мутантного белка. В некоторых вариантах осуществления одного введения описанной в данном документе гидовой РНК SERPINA1 достаточно для нокдауна или нокаута экспрессии мутантного белка. В других вариантах осуществления может быть целесообразно осуществлять более одного введения описанной в данном документе гидовой РНК SERPINA1 для максимизации редактирования за счет кумулятивного эффекта.

В некоторых вариантах осуществления введение описанных в данном документе гидовых РНК альбумина снижает уровни циркулирующего альфа-1-антитрипсина (ААТ), вырабатываемого субъектом, и, следовательно, предотвращает повреждение, связанное с высокой активностью эластазы нейтрофилов.

В некоторых вариантах осуществления однократного введения или многократного введения описанной в данном документе вставочной гидовой РНК достаточно для повышения экспрессии функционального белка ААТ. В некоторых вариантах осуществления однократного введения или многократного введения описанной в данном документе вставочной гидовой РНК достаточно для восполнения или восстановления экспрессии активности белка ААТ. В некоторых вариантах осуществления вставочная гидовая РНК приводит к повышению сывороточных уровней ААТ, например, до защитных уровней (например, до или выше 80 мг/дл по данным измерения методом иммунодиффузии или до или выше 50 мг/дл по данным измерения с использованием нефелометрии или иммунотурбидиметрии и очищенного стандарта). В некоторых вариантах осуществления вставочная гидовая РНК приводит к повышению сывороточных уровней ААТ, например, до нормальных уровней (например, 150-350 мг/дл по данным измерения методом иммунодиффузии или 90-200 мг/дл по данным измерения с использованием нефелометрии или иммунотурбидиметрии и очищенного стандарта). В некоторых вариантах осуществления вставочная гидовая РНК приводит к улучшению гистологической градации связанного с ААТД заболевания печени, например, на 1, 2, 3 или более пунктов, по сравнению с контролем, например, до и после лечения. В некоторых вариантах осуществления вставочная гидовая РНК приводит к улучшению оценки фиброза по шкале Исхака по сравнению с контролем, например, до и после лечения. В некоторых вариантах осуществления одно введение улучшает показатели заболевания легких, например, по данным анализа тестирования функции легких (ТФЛ), функциональной остаточной емкости (ФОЕ) и/или плотности легких при общей емкости легких (ОЕЛ). В других вариантах осуществления может быть целесообразно осуществлять более одного введения описанной в данном документе вставочной гидовой РНК для максимизации редактирования за счет кумулятивного эффекта.

В некоторых вариантах осуществления эффективность лечения предложенными в данном документе композициями наблюдается через 1 год, 2 года, 3 года, 4 года, 5 лет или 10 лет после доставки.

В некоторых вариантах осуществления лечение замедляет или останавливает прогрессирование заболевания легких, связанного с ААТД. В некоторых вариантах осуществления лечение улучшает показатели заболевания легких. В некоторых вариантах осуществления заболевание легких определяют по изменению структуры легких, функции легких или симптомов у субъекта. В некоторых вариантах осуществления эффективность лечения определяют по увеличению времени жизни субъекта.

В некоторых вариантах осуществления эффективность лечения определяют по замедлению развития легочных заболеваний. В некоторых вариантах осуществления эффективность лечения определяют по клиническому улучшению одного или более из ХОБЛ, эмфиземы или диспноэ. В некоторых вариантах осуществления эффективность лечения определяют по улучшению одного или более из кашля, выработки слизи или свистящего дыхания.

В некоторых вариантах осуществления лечение замедляет или останавливает прогрессирование заболевания печени. В некоторых вариантах осуществления лечение улучшает показатели заболевания печени. В некоторых вариантах осуществления заболевание печени определяют по изменению структуры печени, функции печени или симптомов у субъекта.

В некоторых вариантах осуществления эффективность лечения определяют по возможности отсрочить или избежать трансплантации печени у субъекта. В некоторых вариантах осуществления эффективность лечения определяют по увеличению времени жизни субъекта.

В некоторых вариантах осуществления эффективность лечения определяют по снижению печеночных ферментов в крови. В некоторых вариантах осуществления печеночные ферменты представляют собой аланинтрансаминазу (АЛТ) или асператтрансаминазу (АСТ).

В некоторых вариантах осуществления эффективность лечения определяют по замедлению развития фиброзной ткани или снижению количества фиброзной ткани в печени на основании результатов биопсии.

В некоторых вариантах осуществления эффективность лечения определяют, используя данные, сообщаемые пациентами, такие как утомляемость, слабость, зуд, потеря аппетита, потеря массы, тошнота или вздутие живота. В некоторых вариантах осуществления эффективность лечения определяют по снижению отека, асцитов или желтухи. В некоторых вариантах осуществления эффективность лечения определяют по снижению портальной гипертензии. В некоторых вариантах осуществления эффективность лечения определяют по снижению уровня рака печени.

В некоторых вариантах осуществления эффективность лечения определяют, используя методы визуализации. В некоторых вариантах осуществления методы визуализации представляют собой ультразвуковое исследование, компьютерную томографию, магнито-резонансную томографию или эластографию.

В некоторых вариантах осуществления сывороточные и/или печеночные уровни

ААТ (например, функционального ААТ или ААТ дикого типа) снижены на 40-50%, 50-60%, 60-70%, 70-80%, 80-90%, 90-95%, 95-98%, 98-99% или 99-100% по сравнению с сывороточными и/или печеночными уровнями ААТ (например, мутантного нефункционального ААТ) до введения композиции.

В некоторых вариантах осуществления процент редактирования гена SERPINA1 составляет от 30 до 99%. В некоторых вариантах осуществления 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%.

В некоторых вариантах осуществления предложено применение любых одной или более гидовых РНК (гРНК альбумина; и/или гРНК SERPINA1), содержащих любые одну или более направляющих последовательностей из таблицы 1, или таблицы 2, или таблицы 3 (например, в предложенной в данном документе композиции), для изготовления лекарственного средства для лечения человека-субъекта, имеющего ААТД.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложена комбинированная терапия, включающая любые одну или более гРНК, содержащих любые одну или более направляющих последовательностей, описанных в таблице 1 или таблице 2, вместе с заместительной терапией, подходящей для облегчения легочных симптомов ААТД. В некоторых вариантах осуществления заместительная терапия при заболевании легких представляет собой внутривенную терапию ААТ, очищенным из плазмы, как описано, например, в Turner, BioDrugs 2013 Dec;27(6):547-58. В некоторых вариантах осуществления заместительную терапию осуществляют с помощью Проластина[®], Земаира[®], Араласта[®] или Камады[®].

В некоторых вариантах осуществления комбинированная терапия включает любые одну или более гРНК, содержащих любые одну или более направляющих последовательностей, описанных в таблице 1 или таблице 2, вместе с миРНК, нацеленной на АТТ или мутантный АТТ. В некоторых вариантах осуществления миРНК представляет собой любую миРНК, способную дополнительно снизить или устранить экспрессию АТТ дикого типа или мутантного АТТ. В некоторых вариантах осуществления миРНК вводят после любых одной или более гРНК, содержащих любые одну или более направляющих последовательностей, описанных в таблице 1 или таблице 2. В некоторых вариантах осуществления миРНК вводят на постоянном основании после лечения любыми их предложенных в данном документе композиций гРНК.

В некоторых вариантах осуществления комбинированная терапия включает любые одну или более гРНК, содержащих любые одну или более направляющих последовательностей, описанных в таблице 1 или таблице 2, вместе с одним или более вариантами лечения для отказа от курения, превентивной вакцинацией, бронхорасширительными средствами, кислородной терапией при наличии показаний и физической реабилитацией по программе, аналогичной разработанной для пациентов со связанной с курением ХОБЛ.

Это описание и типовые варианты осуществления не следует рассматривать как

ограничивающие. В целях данного описания и прилагаемых вариантов осуществления, если не указано иное, все числа, выражающие количества, проценты или доли, и другие числовые значения, используемые в описании и вариантах осуществления, следует понимать как модифицируемые во всех случаях термином «около» при условии, что они еще не модифицированы таким образом. Соответственно, если не указано иное, числовые параметры, приведенные в нижеследующем описании и прилагаемых вариантах осуществления, являются приближениями, которые могут варьироваться в зависимости от необходимых свойств, которые должны быть получены. По меньшей мере и без попытки ограничить применение доктрины эквивалентов объемом формулы изобретения, каждый числовой параметр следует толковать по меньшей мере в контексте количества приведенных значимых цифр и с применением обычных методов округления.

Последовательность белка ААТ человека (SEQ ID NO: 700) NCBI Ref: NP_000286:

MPSSVSWGILLAGLCLVPVSLAEDPQGDAAQKTDTSHTDQDHPTFNKITPNL
AEFAFSLYRQLAHQSNSTNIFFSPVSIATAFAMLSLGTKADTHDEILEGLNFNLTETPEAQI
HEGFQELLRTLNPDSQLQLTTGNGLFLSEGLKLVDFLEDVKKLYHSEAFTVNFQDTE
EAKKQINDYVEKGTQGKIVDLVKELDRDTVFALVNYIFFKKGKWERPFVVDTEEDFH
VDQVTTVKVPMKRLGFMFNIQHCKKLSSWVLLMKYLGNATAIFFLPDEGKLQHLENE
LTHDIITKFLNEDRRSASLHLPKLSITGTYDLKSVLGQLGITKVFSNGADLSGVTEEAPL
KLSKAVHKAVLTIDEKGTEAAGAMFLEAIPMSIPPEVKFNKPFVFLMIEQNTKSPLFMGK
VVNPTQK

Нуклеотидная последовательность ААТ человека (SEQ ID NO: 701) NCBI Ref: NM_000295):

ACAATGACTCCTTTTCGGTAAGTGCAGTGGAAGCTGTACACTGCCCAGGCAAA
GCGTCCGGGCAGCGTAGGCGGGCGACTCAGATCCCAGCCAGTGGACTTAGCCCCCTG
TTTGCTCCTCCGATAACTGGGGTGACCTTGGTTAATATTCACCAGCAGCCTCCCCCGT
TGCCCCCTCTGGATCCACTGCTTAAATACGGACGAGGACAGGGCCCTGTCTCCTCAGC
TTCAGGCACCACCACTGACCTGGGACAGTGAATCGACAATGCCGTCTTCTGTCTCGT
GGGGCATCCTCCTGCTGGCAGGCCTGTGCTGCCTGGTCCCTGTCTCCCTGGCTGAGG
ATCCCCAGGGAGATGCTGCCCAGAAGACAGATACATCCCACCATGATCAGGATCAC
CCAACCTTCAACAAGATCACCCCAACCTGGCTGAGTTCGCCTTCAGCCTATAACCGC
CAGCTGGCACACCAGTCCAACAGCACCAATATCTTCTTCTCCCCAGTGAGCATCGCT
ACAGCCTTTGCAATGCTCTCCCTGGGGACCAAGGCTGACACTCACGATGAAATCCTG
GAGGGCCTGAATTTCAACCTCACGGAGATTCCGGAGGCTCAGATCCATGAAGGCTT
CCAGGAACTCCTCCGTACCCTCAACCAGCCAGACAGCCAGCTCCAGCTGACCACCG
GCAATGGCCTGTTCCCTCAGCGAGGGCCTGAAGCTAGTGGATAAGTTTTTGGAGGATG
TTAAAAGTTGTACCACTCAGAAGCCTTCACTGTCAACTTCGGGGACACCGAAGAG
GCCAAGAAACAGATCAACGATTACGTGGAGAAGGGTACTCAAGGGAAAATTGTGG
ATTTGGTCAAGGAGCTTGACAGAGACACAGTTTTTGTCTCTGGTGAATTACATCTTCT
TTAAAGGCAAATGGGAGAGACCCTTTGAAGTCAAGGACACCGAGGAAGAGGACTTC
CACGTGGACCAGGTGACCACCGTGAAGGTGCCTATGATGAAGCGTTTAGGCATGTTT

AACATCCAGCACTGTAAGAAGCTGTCCAGCTGGGGTGCTGCTGATGAAATACCTGGG
CAATGCCACCGCCATCTTCTTCCTGCCTGATGAGGGGAAACTACAGCACCTGGAAAA
TGAACTCACCCACGATATCATCACCAAGTTCCTGGAAAATGAAGACAGAAGGTCTG
CCAGCTTACATTTACCCAAACTGTCCATTACTGGAACCTATGATCTGAAGAGCGTCC
TGGGTCAACTGGGCATCACTAAGGTCTTCAGCAATGGGGCTGACCTCTCCGGGGTCA
CAGAGGAGGCACCCCTGAAGCTCTCCAAGGCCGTGCATAAGGCTGTGCTGACCATC
GACGAGAAAGGGACTGAAGCTGCTGGGGCCATGTTTTTAGAGGCCATACCCATGTC
TATCCCCCCCCGAGGTCAAGTTCAACAAACCCTTTGTCTTCTTAATGATTGAACAAAA
TACCAAGTCTCCCTCTTCATGGGAAAAGTGGTGAATCCCACCCAAAAATAACTGCC
TCTCGCTCCTCAACCCCTCCCTCCATCCCTGGCCCCCTCCCTGGATGACATTAAGA
AGGGTTGAGCTGGTCCCTGCCTGCATGTGACTGTAAATCCCTCCCATGTTTTCTCTGA
GTCTCCCTTTGCCTGCTGAGGCTGTATGTGGGCTCCAGGTAACAGTGCTGTCTTCGG
GCCCCCTGAACTGTGTTTCATGGAGCATCTGGCTGGGTAGGCACATGCTGGGCTTGAA
TCCAGGGGGGACTGAATCCTCAGCTTACGGACCTGGGCCCATCTGTTTCTGGAGGGC
TCCAGTCTTCCTTGTCTGTCTTGGAGTCCCCAAGAAGGAATCACAGGGGAGGAACC
AGATAACAGCCATGACCCAGGCTCCACCAAGCATCTTCATGTCCCCCTGCTCATCC
CCACTCCCCCCCACCCAGAGTTGCTCATCCTGCCAGGGCTGGCTGTGCCACCCCA
AGGCTGCCCTCCTGGGGGCCCCAGAACTGCCTGATCGTGCCGTGGCCAGTTTTGTG
GCATCTGCAGCAACACAAGAGAGAGGACAATGTCCTCCTCTTGACCCGCTGTCACCT
AACCAGACTCGGGCCCTGCACCTCTCAGGCACTTCTGGAAAATGACTGAGGCAGAT
TCTTCCTGAAGCCCATTCTCCATGGGGCAACAAGGACACCTATTCTGTCTTGTCTT
CCATCGCTGCCCCAGAAAGCCTCACATATCTCCGTTTAGAATCAGGTCCCTTCTCCC
CAGATGAAGAGGAGGGTCTCTGCTTTGTTTTCTCTATCTCCTCCTCAGACTTGACCAG
GCCCAGCAGGCCCCAGAAGACCATTACCCTATATCCCTTCTCCTCCCTAGTCACATG
GCCATAGGCCTGCTGATGGCTCAGGAAGGCCATTGCAAGGACTCCTCAGCTATGGG
AGAGGAAGCACATCACCCATTGACCCCGCAACCCCTCCCTTTCCTCCTCTGAGTCC
CGACTGGGGCCACATGCAGCCTGACTTCTTTGTGCCTGTTGCTGTCCCTGCAGTCTTC
AGAGGGCCACCGCAGCTCCAGTGCCACGGCAGGAGGCTGTTCTGAATAGCCCCCTG
TGGTAAGGGCCAGGAGAGTCCTTCCATCCTCCAAGGCCCTGCTAAAGGACACAGCA
GCCAGGAAGTCCCCTGGGCCCTAGCTGAAGGACAGCCTGCTCCCTCCGTCTCTACC
AGGAATGGCCTTGTCTATGGAAGGCACTGCCCCATCCCAAATAATCTAGGAATCA
CTGTCTAACCACTCACTGTCATGAATGTGTACTIONTAAAGGATGAGGTTGAGTCATACC
AAATAGTGATTTTCGATAGTTCAAAAATGGTGAAATTAGCAATTCTACATGATTCAGTC
TAATCAATGGATAACCGACTGTTTCCCACACAAGTCTCCTGTTCTCTTAAGCTTACTCA
CTGACAGCCTTTCACTCTCCACAAATACATTAAGATATGGCCATCACCAAGCCCC
TAGGATGACACCAGACCTGAGAGTCTGAAGACCTGGATCCAAGTTCTGACTTTTCCC
CCTGACAGCTGTGTGACCTTCGTGAAGTCGCCAAACCTCTCTGAGCCCCAGTCATTG
CTAGTAAGACCTGCCTTTGAGTTGGTATGATGTTCAAGTTAGATAACAAAATGTTTA
TACCCATTAGAACAGAGAATAAATAGAACTACATTTCTTGCA

Полипептид альфа-1-антитрипсина, кодируемый P00450 (SEQ ID NO: 702):

EDPQGDAQAQKTDTSHHQDHPFNKITPNLAEFASFSLYRQLAHQSNSTNIFFS
 SIATAFAMLSLGTKADTHDEILEGLNFNLTEIPEAQIHEGFQELLRTLNPDSQLQLTTGN
 GLFLSEGLKLVDFKLEDVKKLYHSEAFVNFVGDTEEAQKQINDYVEKGTQGKIVDLVKE
 LDRDRTVFALVNYIFFKGGKWERPFVVDTEEEEDFHVDQVTTVKVPMMKRLGMFNIQHCK
 KLSSWVLLMKYLGNATAIFFLPDEGKLQHLENELTHDIITKFLNEDRRSASLHLPKLSIT
 GTYDLKSVLGQLGITKVFSNGADLSGVTEEAAPLKLSKAVHKAVLTIDEKGTAAAGAMFL
 EAIPMSIPPEVKFNKPFVFLMIEQNTKSPLFMGKVVNPTQK

Сигнальная последовательность белка ААТ человека (SEQ ID NO: 1129)

MPSSVSWGILLLAGLCCLVPVSLA

ПРИМЕРЫ

Нижеприведенные примеры представлены для иллюстрации определенных описанных вариантов осуществления и их не следует воспринимать как ограничивающие каким-либо образом объем данного изобретения.

Пример 1 - Материалы и методы

Клонирование и получение плазмиды

Двунаправленная вставочная конструкция, фланкируемая ИКП AAV2, была синтезирована и клонировали в pUC57-Kan коммерческим поставщиком. Полученную в результате конструкцию (P00147) использовали в качестве исходного клонирующего вектора для других векторов. Другие вставочные конструкции (без ИКП) также были коммерчески синтезированы и клонированы в pUC57. Очищенную плазмиду расщепляли рестрикционным ферментом BglII (New England BioLabs, кат. № R0144S), и клонировали вставочные конструкции в исходный вектор. Плазмиду размножали в химически компетентных ^{E.coli} Stb13 TM (Thermo Fisher, кат. № C737303).

Получение AAV

Тройную трансфекцию клеток HEK293 использовали для упаковки геномов представляющими интерес конструкциями для получения AAV8 и AAV-DJ, а полученные в результате векторы очищали как из лизированных клеток, так и из культуральной среды методом ультрацентрифугирования в градиенте йодиксанола (смотрите, например, Lock et al., Hum Gene Ther. 2010 Oct;21(10):1259-71). Плазмиды, используемые в тройной трансфекции, которые содержали геном с представляющими интерес конструкциями, обозначены в примерах по номеру «PXXXX», также смотрите, например, таблицу 14. Выделенный AAV подвергали диализу в буфере для хранения (ФСБ с 0,001% плюроники F68). Титр AAV определяли с помощью кПЦР, используя праймеры/зонд, локализованные в области ИКП.

In vitro транскрипция («IVT») мРНК нуклеазы

Кэпированную и полиаденилированную мРНК Cas9 Streptococcus pyogenes («Spy»), содержащую N1-метил псевдо-U, создавали посредством транскрипции in vitro транскрипции, используя линейаризованную плазмидную ДНК-матрицу и РНК-полимеразу T7. В общем случае плазмидную ДНК, содержащую промотор T7 и область поли-(A/T) из 100 нуклеотидов, линейаризовали путем инкубации при 37°C с XbaI для полного

расщепления с последующей тепловой инактивацией XbaI при 65°C в течение 20 мин. Линеаризованную плазмиду очищали от фермента и буферных солей. Реакцию IVT для создания модифицированной мРНК Cas9 инкубировали при 37°C в течение 4 часов в следующих условиях: 50 нг/мкл линеаризованной плазмиды; 2 мМ каждого из ГТФ, АТФ, ЦТФ и N1-метил псевдо-UTP (Trilink); 10 мМ ARCA (Trilink); 5 Е/мкл РНК-полимеразы T7 (NEB); 1 Е/мкл мышинового ингибитора РНКазы (NEB); 0,004 Е/мкл неорганической пирофосфатазы E. coli (NEB); и 1x реакционного буфера. ДНКазу TURBO (ThermoFisher) добавляли до конечной концентрации 0,01 Е/мкл и инкубировали реакцию еще в течение 30 минут, чтобы удалить ДНК-матрицу. мРНК Cas9 очищали, используя набор для очистки MegaClear Transcription Clean-up в соответствии с протоколом производителя (ThermoFisher). В альтернативном варианте мРНК Cas9 очищали, используя осаждение LiCl, осаждение ацетатом аммония и осаждение ацетатом натрия или используя метод осаждения LiCl с последующей очисткой путем фильтрации с тангенциальным потоком. Концентрацию транскрипта определяли путем измерения поглощения света на 260 нм (Nanodrop), а транскрипт анализировали методом капиллярного электрофореза с помощью Bioanalyzer (Agilent).

Нижеприведенные мРНК Cas9 содержат OPC Cas9 SEQ ID NO: 288 или последовательность из Таблицы 24 в PCT/US2019/053423 (которая включена в данный документ посредством ссылки).

SEQ ID NO: 288:

ATGGATAAGAAGTACTCAATCGGGCTGGATATCGGAACTAATTCGGTGGGTT
GGGCAGTGATCACGGATGAATACAAAGTGCCGTCCAAGAAGTTCAAGGTCCTGGGG
AACACCGATAGACACAGCATCAAGAAAAATCTCATCGGAGCCCTGCTGTTTTGACTC
CGGCGAAACCGCAGAAGCGACCCGGCTCAAACGTACCGCGAGGGCGACGCTACACCC
GGCGGAAGAATCGCATCTGCTATCTGCAAGAGATCTTTTCGAACGAAATGGCAAAG
GTCGACGACAGCTTCTTCCACCGCCTGGAAGAATCTTTCCTGGTGGAGGAGGACAA
GAAGCATGAACGGCATCCTATCTTTGGAAACATCGTCGACGAAGTGGCGTACCACG
AAAAGTACCCGACCATCTACCATCTGCGGAAGAAGTTGGTTGACTCAACTGACAAG
GCCGACCTCAGATTGATCTACTTGGCCCTCGCCCATATGATCAAATTCGCGGACAC
TTCCTGATCGAAGGCGATCTGAACCCTGATAACTCCGACGTGGATAAGCTTTTCATT
CAACTGGTGCAGACCTACAACCAACTGTTTCGAAGAAAACCCAATCAATGCTAGCGG
CGTCGATGCCAAGGCCATCCTGTCCGCCCGGCTGTCGAAGTCGCGGCGCCTCGAAA
ACCTGATCGCACAGCTGCCGGGAGAGAAAAAGAACGGACTTTTCGGCAACTTGATC
GCTCTCTCACTGGGACTCACTCCCAATTTCAAGTCCAATTTTGACCTGGCCGAGGAC
GCGAAGCTGCAACTCTCAAAGGACACCTACGACGACGACTTGGACAATTTGCTGGC
ASAAATTGGCGATCAGTACGCGGATCTGTTCCCTTGCCGCTAAGAACSTTTCGGACGC
AATCTTGCTGTCCGATATCCTGCGCGTGAACACCGAAATAACCAAAGCGCCGCTTAG
CGCCTCGATGATTAAGCGGTACGACGAGCATCACCAGGATCTCACGCTGCTCAAAG
CGCTCGTGAGACAGCAACTGCCTGAAAAGTACAAGGAGATCTTCTTCGACCAGTCC
AAGAATGGGTACGCAGGGTACATCGATGGAGGCGCTAGCCAGGAAGAGTTCTATAA

GTTCATCAAGCCAATCCTGGAAAAGATGGACGGAACCGAAGAAGCTGCTGGTCAAGC
TGAACAGGGAGGATCTGCTCCGGAAACAGAGAACCTTTGACAACGGATCCATTCCC
CACCAGATCCATCTGGGTGAGCTGCACGCCATCTTGCGGCGCCAGGAGGACTTTTAC
CCATTCTCAAGGACAACCGGGAAAAGATCGAGAAAATTCTGACGTTCCGCATCCC
GTATTACGTGGGCCCACTGGCGCGCGGCAATTCGCGCTTCGCGTGGATGACTAGAA
AATCAGAGGAAACCATCACTCCTTGGAAATTCGAGGAAGTTGTGGATAAGGGAGCT
TCGGCACAAAGCTTCATCGAACGAATGACCAACTTCGACAAGAATCTCCCAAACGA
GAAGGTGCTTCTAAGCACAGCCTCCTTTACGAATACTTCACTGTCTACAACGAACT
GACTAAAGTGAAATACGTTACTGAAGGAATGAGGAAGCCGGCCTTTCTGTCCGGAG
AACAGAAGAAAGCAATTGTCGATCTGCTGTTCAAGACCAACCGCAAGGTGACCGTC
AAGCAGCTTAAAGAGGACTACTTCAAGAAGATCGAGTGTTTCGACTCAGTGGAAT
CAGCGGGGTGGAGGACAGATTCAACGCTTCGCTGGGAACCTATCATGATCTCCTGA
AGATCATCAAGGACAAGGACTTCCTTGACAACGAGGAGAACGAGGACATCCTGGAA
GATATCGTCCTGACCTTGACCCTTTTCGAGGATCGCGAGATGATCGAGGAGAGGCTT
AAGACCTACGCTCATCTCTTCGACGATAAGGTCATGAAACAACCTCAAGCGCCGCCG
GTACACTGGTTGGGGCCGCCTCTCCCGCAAGCTGATCAACGGTATTCGCGATAAACA
GAGCGGTAAAACTATCCTGGATTTCTCAAATCGGATGGCTTCGCTAATCGTAACTT
CATGCAATTGATCCACGACGACAGCCTGACCTTTAAGGAGGACATCCAAAAGCAC
AAGTGTCCGGACAGGGAGACTCACTCCATGAACACATCGCGAATCTGGCCGGTTCG
CCGGCGATTAAGAAGGGAATTCTGCAAACCTGTGAAGGTGGTCGACGAGCTGGTGAA
GGTCATGGGACGGCACAAACCGGAGAATATCGTGATTGAAATGGCCCGAGAAAACC
AGACTACCCAGAAGGGCCAGAAAACTCCCGCGAAAGGATGAAGCGGATCGAAGA
AGGAATCAAGGAGCTGGGCAGCCAGATCCTGAAAGAGCACCCGGTGGAAAACACG
CAGCTGCAGAACGAGAAGCTCTACCTGTACTATTTGCAAATGGACGGGACATGTA
CGTGGACCAAGAGCTGGACATCAATCGGTTGTCTGATTACGACGTGGACCACATCGT
TCCACAGTCCTTTCTGAAGGATGACTCGATCGATAACAAGGTGTTGACTCGCAGCGA
CAAGAACAGAGGGAAGTCAGATAATGTGCCATCGGAGGAGGTTCGTGAAGAAGATG
AAGAATTACTGGCGGCAGCTCCTGAATGCGAAGCTGATTACCCAGAGAAAGTTTGA
CAATCTCACTAAAGCCGAGCGCGGCGGACTCTCAGAGCTGGATAAGGCTGGATTCA
TCAAACGGCAGCTGGTCGAGACTCGGCAGATTACCAAGCACGTGGCGCAGATCTTG
GACTCCCGCATGAACACTAAATACGACGAGAACGATAAGCTCATCCGGGAAGTGAA
GGTGATTACCCTGAAAAGCAAACCTTGTGTCGGACTTTCGGAAGGACTTTCAGTTTTA
CAAAGTGAGAGAAATCAACAACCTACCATCACGCGCATGACGCATACCTCAACGCTG
TGGTCGGTACCGCCCTGATCAAAAAGTACCCTAAACTTGAATCGGAGTTTGTGTACG
GAGACTACAAGGTCTACGACGTGAGGAAGATGATAGCCAAGTCCGAACAGGAAATC
GGGAAAGCAAACCTGCGAAATACTTCTTTTACTCAAACATCATGAACTTTTTCAAGACT
GAAATTACGCTGGCCAATGGAGAAATCAGGAAGAGGCCACTGATCGAAACTAACGG
AGAAACGGGCGAAATCGTGTGGGACAAGGGCAGGGACTTCGCAACTGTTTCGCAAAG
TGCTCTCTATGCCGCAAGTCAATATTGTGAAGAAAACCGAAGTGCAAACCGGCGGA
TTTTCAAAGGAATCGATCCTCCCAAAGAGAAATAGCGACAAGCTCATTGCACGCAA

GAAAGACTGGGACCCGAAGAAGTACGGAGGATTCGATTCGCCGACTGTCGCATACT
 CCGTCCTCGTGGTGGCCAAGGTGGAGAAGGGAAAGAGCAAAAAGCTCAAATCCGTC
 AAAGAGCTGCTGGGGATTACCATCATGGAACGATCCTCGTTTCGAGAAGAACCCGAT
 TGATTTCTCGAGGCGAAGGGTTACAAGGAGGTGAAGAAGGATCTGATCATCAAAC
 TCCCCAAGTACTCACTGTTTCGAACTGGAAAATGGTCGGAAGCGCATGCTGGCTTCGG
 CCGGAGAACTCCAAAAAGGAAATGAGCTGGCCTTGCCTAGCAAGTACGTCAACTTC
 CTCTATCTTGCTTCGCACTACGAAAACTCAAAGGGTCACCGGAAGATAACGAACA
 GAAGCAGCTTTTCGTGGAGCAGCACAAGCATTATCTGGATGAAATCATCGAACAAA
 TCTCCGAGTTTTCAAAGCGCGTGATCCTCGCCGACGCCAACCTCGACAAAGTCCTGT
 CGGCCTACAATAAGCATAGAGATAAGCCGATCAGAGAACAGGCCGAGAACATTATC
 CACTTGTTACCCCTGACTAACCTGGGAGCCCCAGCCGCCTTCAAGTACTTCGATACT
 АСТАТCGATCGCAAAAAGATACACGTCCACCAAGGAAGTTCTGGACGCGACCCTGAT
 CCACCAAAGCATCACTGGACTCTACGAAACTAGGATCGATCTGTTCGAGCTGGGTG
 GCGAT

Липидные составы для доставки мРНК Cas9 и гРНК

мРНК Cas9 и гРНК доставляли в клетки и организм животных, используя липидные составы, содержащие ионизируемый липид (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-диеноатом), холестерин, ДСФХ и ПЭГ2т-ДМГ.

Для экспериментов с использованием предварительно смешанных липидных составов (называемых в данном документе «липидными пакетами») компоненты восстанавливали в 100% этаноле в молярном соотношении ионизируемый липид:холестерин:ДСФХ:ПЭГ2т-ДМГ 50:38:9:3 перед смешиванием с нагрузкой РНК (например, мРНК Cas9 и гРНК) в молярном соотношении липидного амина к РНК-фосфату (N:P) около 6,0, как дополнительно описано в данном документе.

Для экспериментов с использованием компонентов, составленных в виде липидных наночастиц (ЛНЧ), компоненты растворяли в 100% этаноле в различных молярных соотношениях. РНК-карго (например, мРНК Cas9 и гРНК) растворяли в 25 мМ цитрате, 100 мМ NaCl, pH 5,0, что приводило к получению концентрации РНК-карго приблизительно 0,45 мг/мл.

Для экспериментов ЛНЧ получали, используя метод поперечного потока с использованием смешивания с ударной струей липида в этаноле с двумя объемами растворов РНК и одним объемом воды. Липид в этаноле смешивали с помощью смешивающей крестовины с двумя объемами раствора РНК. Четвертый поток воды смешивали с выходным потоком крестовины через встроенный тройник (смотрите WO2016010840, Фиг. 2). ЛНЧ выдерживали в течение 1 часа при комнатной температуре, а затем разводили водой (приблизительно 1:1 об./об.). Разведенные ЛНЧ

концентрировали, используя фильтрацию с тангенциальным потоком на плоском картридже (Sartorius, НОММ 100 кДа), а потом проводили замену буфера посредством диафильтрации в 50 мМ Трис, 45 мМ NaCl, 5% (масс./об.) сахарозы, pH 7,5 (TSS). В альтернативном варианте окончательную замену буфера на TSS проводили с помощью обессоливающих колонок PD-10 (GE). При необходимости составы концентрировали путем центрифугирования на 100 кДа центробежных фильтрах Amicon (Millipore). Потому полученную в результате смесь фильтровали, используя 0,2 мкм стерильный фильтр. Конечные ЛНЧ хранили при 4 °С или -80°С до дальнейшего использования. ЛНЧ составляли в молярном соотношении ионизируемый липид:холестерин:ДСФХ:ПЭГ2т-ДМГ, равном 50:38:9:3, с молярным отношением липидного амина к РНК-фосфату (N:P) около 6,0 и соотношением гРНК к мРНК 1:1 по массе.

Культура клеток и in vitro доставка мРНК Cas9, гРНК и вставочных конструкций

Первичные гепатоциты

Первичные гепатоциты мыши (ПГМ), первичные гепатоциты крысы (ПГК) и первичные гепатоциты человека (ПГЧ) размораживали и ресуспендировали в среде для размораживания гепатоцитов с добавками (ThermoFisher) с последующим центрифугированием. Супернатант сливали, а осажденные клетки ресуспендировали в среде для посева гепатоцитов с набором добавок (ThermoFisher). Клетки подсчитывали и высевали в покрытые коллагеном I Bio-coat 96-луночные планшеты при плотности 33000 клеток/луночка для ПГЧ, 50000 клеток/луночка для ПГЯ, 35000 клеток/луночка для ПГК и 15000 клеток/луночка для ПГМ. Высеянные клетки оставляли для осаждения и прикрепления на 6 часов в инкубаторе для тканевого культивирования при 37 °С и атмосфере с 5% CO₂. После инкубации клетки проверяли в отношении образования монослоя, дважды промывали с сохранением гепатоцитов и инкубировали при 37 °С.

Для экспериментов, в которых использовали доставку MessengerMax, 100 нг мРНК Cas9 и 25 нМ гРНК каждую по отдельности разводили в среде Opti-MEM. Реагент MessengerMAX разводили в Opti-MEM и инкубировали в течение 10 мин перед добавлением в каждую пробирку, содержащую мРНК Cas9 или гРНК. Инкубировали в течение 5 мин перед доведением до 50 мкл средой для поддержания гепатоцитов. Из всех клеток аспирировали среду перед трансфекцией 50 мкл смеси MessengerMAX/мРНК Cas9 и смеси MessengerMAX/гРНК в клетки с последующим добавлением AAV (разведенного в среде для поддержания) при 1,3 × 10⁵ для ПГМ или 1 × 10⁶ для ПГК. Среду собирали через 72 часа после обработки для анализа, а клетки собирали для дополнительного анализа, как описано в данном документе.

Для экспериментов, в которых использовали доставку ЛНЧ, различный объем ЛНЧ, содержащих необходимую концентрацию Cas9/гРНК, разводили средой для поддержания гепатоцитов, дополненной 3% ФБС, и инкубировали при 37 градусах в течение 10 мин. Из всех клеток аспирировали среду перед добавлением в клетки 100 мкл смеси ЛНЧ/среда с последующим добавлением AAV (разведенного в среде для

поддержания) при 1×10^5 для ПГМ или 1×10^6 для ПГК. Среду собирали через 72 часа после обработки для анализа, а клетки собирали для дополнительного анализа, как описано в данном документе. Для экспериментов с использованием липидной пакетной доставки мРНК Cas9 и гРНК, каждую, отдельно разводили в 2 мг/мл в поддерживающей среде и добавляли по 2,9 мкл каждой в лунки (в 96-луночном планшете Эппендорфа), содержащие 12,5 мкл 50 мМ цитрата натрия, 200 мМ хлорида натрия при pH 5 и 6,9 мкл воды. После этого добавляли 12,5 мкл липидного пакетного состава с последующим добавлением 12,5 мкл воды и 150 мкл TSS. Каждую лунку разводили до 20 нг/мкл (по отношению к общему содержанию РНК), используя поддерживающую среду для гепатоцитов, а затем разводили до 10 нг/мкл (относительно общего содержания РНК) 6% свежей мышинной сывороткой. Среду отсасывали из клеток перед трансфекцией и добавляли к клеткам 40 мкл смесей липидный пакет/РНК с последующим добавлением AAV (разведенного в поддерживающей среде) при 1×10^5 . Среду собирали через 72 часа после обработки для анализа, а клетки собирали для дополнительного анализа, как описано в данном документе.

Анализ с люциферазой

Для экспериментов, включающих обнаружение NanoLuc в клеточной среде, один объем субстрата для анализа люциферазы Nano-Glo® объединяли с 50 объемами буфера для анализа люциферазы Nano-Glo®. Анализ проводили на оборудовании Promega Glomax со временем интеграции 0,5 с, используя 50 мкл образцов или 1:10 разведение образцов (50 мкл реагента+40 мкл воды+10 мкл клеточной среды). Для экспериментов, включающих обнаружение тега HiBit в клеточной среде, белок LgBiT и внеклеточный субстрат Nano-GloR HiBiT разводили 1:100 и 1:50, соответственно, во внеклеточном буфере Nano-GloR HiBiT при комнатной температуре. Анализ проводили на оборудовании Promega Glomax со временем интеграции 1,0 с, используя 1:10 разведение образцов (50 мкл реагента+40 мкл воды+10 мкл клеточной среды).

In vivo доставка ЛНЧ и/или AAV

Мышам и крысам вводили дозу AAV, ЛНЧ, как AAV, так и ЛНЧ, или носителей (ФСБ+0,001% плуороник для носителя AAV, TSS для носителя ЛНЧ) через боковую хвостовую вену. AAV вводили в объеме 0,1 мл на животное в количествах (векторных геномов/мышь, «вг/мш»), описанных в данном документе. ЛНЧ разводили в TSS и вводили в количествах, указанных в данном документе, в дозе около 5 мкл/грамм массы тела. Как правило, мышам сначала вводили AAV, а затем, если это было нужно, ЛНЧ. В различные моменты времени после обработки брали сыворотку и/или ткань печени для определенных анализов, как дополнительно описано ниже.

Секвенирование нового поколения («NGS») и анализ эффективности целевого расщепления

Для выявления наличия вставок и делеций, внесенных за счет генного редактирования, например, в интроне 1 альбумина, использовали глубинное секвенирование. ПЦР-праймеры конструировали вокруг целевого сайта и

амплифицировали представляющую интерес область генома. Конструирование последовательности праймеров выполняли как принято в данной области.

Дополнительную ПЦР проводили в соответствии с протоколами производителя (Illumina) для добавления химии для секвенирования. Ампликоны секвенировали на приборе Illumina MiSeq. Чтения выравнивали с референсным геномом после исключения тех, которые имели низкие оценки качества. Полученные в результате файлы, содержащие чтения, картировали на референсный геном (файлы BAM), где выбирали чтения, которые перекрывали представляющую интерес целевую область, и рассчитывали число чтений дикого типа в сравнении с числом чтений, содержащих вставку или делецию («индель»).

Процент редактирования (например, «эффективность редактирования» или «процент редактирования») определяется как общее количество чтений последовательностей со вставками или делециями («инделями») по сравнению с общим числом чтений последовательностей, включая дикий тип.

ELISA-анализ альфа-1-антитрипсина человека (hA1AT)

Для *in vivo* исследований собирали кровь и выделяли сыворотку, как указано. Общие уровни альфа-1-антитрипсина человека определяли, используя набор для ELISA альфа-1-антитрипсина (человека) (Aviva Biosystems, кат. № OKIA00048 или Abcam, кат. № ab108799), в соответствии с протоколом производителя. Сывороточные уровни hA1AT определяли количественно по стандартной кривой, используя 4-параметрическую логистическую аппроксимацию, и выражали в мкг/мл сыворотки.

ЖХ-МС/МС-анализ альфа-1-антитрипсина человека (hA1AT)

Для *in vivo* исследований собирали кровь и выделяли сыворотку, как указано. Общие уровни hA1AT определяли, используя метод жидкостной хроматографии с tandemной масс-спектрометрией (ЖХ-МС/МС). Очищенный лиофилизированный нативный hA1AT, полученный из плазмы человека, был получен от Athens Research & Technology. Лيوфилизированный hA1AT растворяли в фетальной телячьей сыворотке в соответствующей концентрации для стандартов и контролей качества. Сывороточные образцы разводили в 10 раз в фетальной телячьей сыворотке. 10 мкл 1900 нг/мл стабильных меченных внутренних стандартов добавляли к 10 мкл разведенных фетальной телячьей сывороткой образцов, стандартов и контролей качества. Образцы денатурировали 25 мкл трифторэтанола, разводили 25 мкл 50 мМ бикарбоната аммония непосредственно перед добавлением 5 мкл 200 мМ ДТТ и инкубировали в течение 30 мин при 55°C. Восстановленные образцы обрабатывали 10 мкл 200 мМ йодацетамида и инкубировали в течение одного часа при комнатной температуре в темноте со встряхиванием. Образцы разводили 400 мкл 50 мМ бикарбоната аммония и обрабатывали 20 мкл 1 г/л трипсина, и инкубировали в течение ночи при 37°C. Расщепление прекращали добавлением 10 мкл муравьиной кислоты.

Идентификация пептидов hA1AT дикого типа или мутантных:

Чистое расщепление A1AT анализировали методом ЖХ-МС/МС и идентифицировали сигнатурные пептиды, которые содержали мутантные аллели и аллели

дикого типа. В частности, мутантный hA1AT (Glu342Lys) был обнаружен с помощью интенсивно меченного мутант-специфического пептида (AVLTIDK (SEQ ID NO: 1130)), а hA1AT дикого типа был обнаружен с помощью другого интенсивно меченного специфического к дикому типу пептида (AVLTIDEK (SEQ ID NO: 1131)). Общую концентрацию дикого типа и мутантного hA1AT определяли с помощью третьего интенсивно меченного пептида (SASLHLPK (SEQ ID NO: 1132)). Каждый из этих пептидов синтезировали путем включения одного $^{13}\text{C}_6$ ^{15}N -лейцина в позиции, выделенной жирным и подчеркнутым шрифтом в SEQ ID NO: 1130-1132).

Определение уровней сывороточного hA1AT с помощью масс-спектрометрии:

Сыворотку расщепляли в соответствии с вышеописанными способами. После расщепления расщепленную сыворотку загружали на колонку и анализировали методом ЖХ-МС/МС, как описано ниже. Идентификацию уровней hA1AT дикого типа и объединенных уровней дикого типа и мутанта получали путем сравнения с калибровочной кривой. Уровни мутантного hA1AT получали по односточечной внутренней калибровке.

Условия ЖХ-МС/МС:

Анализ ЖХ-МС/МС проводили на 2,1×50 мм колонке C8. Подвижная фаза А состояла из 0,1% муравьиной кислоты в воде, а подвижная фаза В состояла из 0,1% муравьиной кислоты в ацетонитриле. Промывка иглы состояла из 0,1% муравьиной кислоты, 1% диметилсульфоксида в метаноле: Вода (35:65). Анализ расщепления A1AT проводили на масс-спектрометре со следующими параметрами: (а) Источник ионов: Ионный ускоритель с турбораспылением; (b) Газовая завеса: 35,0; (c) Газ для соударений: Среда; (d) Напряжение ионного ускорителя: 5500; (e) Температура: 500 °C; (f) Газ - источник ионов 1: 50; и (g) Газ - источник ионов 2: 50.

Пример 2 - in vitro скрининг двунаправленной конструкции по целевым сайтам в первичных гепатоцитах мышей

В эксперименте, описанном в этом примере, тестировали вставку hSERPINA1 на панели целевых сайтов, используя 20 разных гРНК, нацеленных на интрон 1 мышинового альбумина, в первичных гепатоцитах мышей (ПГМ).

Материалы для доставки ssAAV и липидных пакетов, тестируемых в этом примере, получали и доставляли в ПГМ, как описано в примере 1, с AAV при 1×10^5 . После обработки выделенную геномную ДНК и клеточную среду собирали для анализа редактирования и экспрессии трансгена, соответственно. Репортерный вектор содержал ОРС NanoLuc (помимо ЗФБ), который можно измерить с помощью регистрации флуоресценции люциферазы, как описано в примере 1, которая отображена на графике на Фиг. 1С в виде относительных единиц люциферазы («ОЕЛ»). Схематическое изображение тестируемого вектора представлено на Фиг. 1А. Протестированные гРНК проиллюстрированы на Фиг. 1В и 1С с использованием сокращенных обозначений для тех, которые перечислены в таблице 11 (например, опущены первые нули, например, «G551» соответствует «G000551» в таблице 11).

Как проиллюстрировано на Фиг. 1В и в таблице 31, были обнаружены различные

уровни редактирования. При этом, как проиллюстрировано на Фиг. 1С и в таблице 31, высокие уровни редактирования не обязательно приводят к более эффективной экспрессии трансгенов.

Таблица 31 - Образование инделей в локусе mAlbumin и экспрессия NanoLuc ЗФБ

ID направляющей	P00415		P00415	
	Среднее значение, индели (%)	Ст. откл., индели (%)	Среднее значение, люцифераза (ОЕЛ)	Ст. откл., люцифераза (ОЕЛ)
G000551	66,73	4,90	78633,33	20274,70
G000552	90,37	1,01	205333,33	30664,86
G000553	80,50	0,85	471666,67	134001,00
G000554	70,60	2,91	232666,67	67002,49
G000555	40,47	4,75	155666,67	15947,83
G000666	65,90	3,99	313000,00	15394,80
G000667	31,67	2,29	153000,00	30805,84
G000668	68,30	4,90	429000,00	120751,80
G000669	18,70	1,25	46466,67	6543,19
G000670	51,97	2,06	424666,67	36473,73
G011722	4,20	0,26	24000,00	8915,16
G011723	5,93	0,15	26100,00	8109,87
G011724	7,13	1,27	30933,33	3365,02
G011725	2,53	0,65	20366,67	13955,05
G011726	12,43	1,33	14950,00	8176,03
G011727	16,20	2,69	86700,00	5023,94
G011728	15,50	1,56	38166,67	13829,08
G011729	6,00	1,01	26966,67	16085,50
G011730	7,33	0,59	41233,33	25687,03
G011731	24,87	1,01	20756,67	13096,20
Только AAV	0,10	0,00	207,00	1,41

Пример 3 - *in vitro* скрининг двунаправленных конструкций по целевым сайтам в первичных гепатоцитах яванского макака и человека

В этом примере ssAAV-векторы, содержащие двунаправленную конструкцию, тестировали на панели целевых сайтов, используя гРНК, нацеленные на интрон 1

альбумина яванского макака («яв. м.») и человека в первичных гепатоцитах яванского макака (ПГЯ) и первичных гепатоцитах человека (ПГЧ), соответственно.

Материалы для доставки ssAAV и липидных пакетов, тестируемых в этом примере, получали и доставляли в ПГЯ и ПГЧ, как описано в примере 1. После обработки выделенную геномную ДНК и клеточную среду собирали для анализа редактирования и экспрессии трансгена, соответственно. Каждый из векторов (полученных из плазмиды P00415) содержал репортер, который можно измерить с помощью регистрации флуоресценции люциферазы, как описано в примере 1, которая отображена на графиках на Фиг. 2В и 3В (полученных из плазмиды P00415) Например, AAV-векторы содержали ОРС NanoLuc (в дополнение к ЗФБ). Схематические изображения тестируемых векторов представлены на Фиг. 2В и 3В. Протестированные гРНК проиллюстрированы на каждой из фигур с использованием сокращенного номера для тех, которые перечислены в таблице 9 и Таблице 13.

Как проиллюстрировано на Фиг. 2А для ПГЯ и на Фиг. 3А для ПГЧ, были обнаружены различные уровни редактирования для каждой из тестируемых комбинаций (данные по редактированию для некоторых комбинаций, которые тестировали в эксперименте ПГЯ, не представлены на Фиг. 2А и в таблице 3 из-за неудачных экспериментов с определенными парами праймеров, используемых для секвенирования ампликона). Данные по редактированию, представленные на Фиг. 2А и 3А графически, численно отображены в таблице 3 и таблице 4 ниже. Однако, как проиллюстрировано на Фиг. 2В, 2С и Фиг. 3В и 3С, высокие уровни редактирования необязательно приводили к более эффективной экспрессии трансгенов, что указывает на слабую корреляцию между редактированием и вставкой/экспрессией двунаправленных конструкций в ПГЯ и ПГЧ, соответственно.

Таблица 3: Данные по редактированию интрона 1 альбумина для гРНК, доставленных в первичные гепатоциты яванского макака		
ID направляющей	Средн. % редактирования	Ст. откл. % редактирования
G009867	25,05	0,21
G009866	18,7	3,96
G009876	14,85	4,88
G009875	12,85	2,33
G009874	28,25	6,01
G009873	42,65	5,59
G009865	59,15	0,21
G009872	48,15	3,46
G009871	46,5	5,23
G009864	33,2	8,34

G009863	54,8	12,45
G009862	44,6	7,21
G009861	28,65	0,21
G009860	33,2	7,07
G009859	0,05	0,07
G009858	14,65	1,77
G009857	23	0,99
G009856	14,8	0,99
G009851	1,5	0,42
G009868	12,15	2,47
G009850	63,45	13,93
G009849	57,55	8,27
G009848	33	5,37
G009847	66,75	7
G009846	61,85	5,02
G009845	54,4	7,5
G009844	47,15	2,05

Таблица 4: Данные по редактированию интрона 1 альбумина для оgРНК, доставленных в первичные гепатоциты человека

ID направляющей	Средн. % редактирования	Ст. откл. % редактирования
G009844	19,07	2,07
G009851	0,43	0,35
G009852	47,20	3,96
G009857	0,10	0,14
G009858	8,63	9,16
G009859	3,07	3,50
G009860	18,80	4,90
G009861	10,27	2,51
G009866	13,60	13,55
G009867	12,97	3,04
G009868	0,63	0,32
G009874	49,13	0,60
G012747	3,83	0,23

G012748	1,30	0,35
G012749	9,77	1,50
G012750	42,73	4,58
G012751	7,77	1,16
G012752	32,93	2,27
G012753	21,20	2,95
G012754	0,60	0,10
G012755	1,10	0,10
G012756	2,17	0,40
G012757	1,07	0,25
G012758	0,90	0,10
G012759	2,60	0,35
G012760	39,10	6,58
G012761	36,17	2,43
G012762	8,50	0,57
G012763	47,07	3,07
G012764	44,57	5,83
G012765	19,90	1,68
G012766	8,50	0,28

Пример 4 - In vivo вставка hSERPINA1 в локус mAlbumin

Тестировали эффективность различных направляющих последовательностей в облегчении вставки hSERPINA1 в локус альбумина мыши. ssAAV и ЛНЧ, тестируемые в этом примере, получали и доставляли мышам, как описано в примере 1. Сыворотку собирали через 1 и 2 недели после введения дозы для измерения сывороточной экспрессии альфа-1-антитрипсина человека (hA1AT). Через четыре недели после введения дозы животных умерщвляли и собирали ткань печени и сыворотку для анализа редактирования и сывороточной экспрессии hA1AT, соответственно. Уровни A1AT человека в сыворотке определяли методом ELISA (Aviva Biosystems, кат. № OKIA00048).

Восемь разных составов ЛНЧ, содержащих 8 разных гРНК, нацеленных на интрон 1 альбумина, доставляли мышам вместе с ssAAV, полученным из P00450. AAV и ЛНЧ доставляли при 1×10^{12} вг/мышь и 1,0 мг/кг (по отношению к общему содержанию РНК-карго), соответственно. гРНК, тестируемые в этом эксперименте, проиллюстрированы на Фиг. 4А и 4В с использованием сокращенных обозначений для тех, которые перечислены в таблице 11. Результаты по редактированию в локусе альбумина мыши проиллюстрированы на Фиг. 4А и в таблице 5. Сывороточные уровни hA1AT проиллюстрированы на Фиг. 4В и в таблице 6 через 1, 2 и 4 недели после введения дозы. На Фиг. 4С приведен график корреляции со сравнением уровней экспрессии, измеренных

в ОЕЛ, для заданной направляющей из *in vitro* эксперимента из примера 1 с уровнями экспрессии трансгена hA1AT, обнаруженными *in vivo* в этом эксперименте с той же направляющей. Значение R^2 0,71 демонстрирует положительную корреляцию между первичным скринингом клеток и *in vivo* обработкой.

Таблица 5: Редактирование в локусе альбумина мыши

Условие	Среднее % инделей	СО	Образцы
G000555	30,4	2,4	5
G011722	23,4	2,6	5
G011723	8,8	2,6	5
G011725	11,7	3,9	5
G000553	47,1	6,1	5
G000666	36,8	6,9	5
G000668	43,6	3,0	5
G000670	44,1	3,4	5

Таблица 6: Уровни hA1AT в сыворотке

Условие	1 неделя			2 неделя			4 неделя		
	Среднее значе- ние (мкг/мл)	СО	Образ- цы (n)	Среднее значе- ние (мкг/мл)	СО	Образ- цы (n)	Среднее значе- ние (мкг/мл)	СО	Образ- цы (n)
G000555	1363	185	5	1409	230	5	1920	410	5
G011722	308	78	5	941	178	5	937	160	5
G011723	327	92	5	447	138	5	489	160	5
G011725	163	40	5	220	47	5	234	20	5
G000553	1259	230	5	1659	356	5	1652	367	5
G000666	1019	317	5	1383	536	5	1743	525	5
G000668	1596	60	5	1725	90	5	2172	234	5
G000670	1694	202	5	2126	292	5	2866	320	5
Плазма человека	2603	53	5						

Пример 5 - In vivo нокдаун трансгена hSERPINA1 PiZ и вставка hSERPINA1 в локус mAlbumin

В этом эксперименте за первым раундом редактирования для нокдауна экспрессии A1AT из вариантного трансгена hSERPINA PiZ (стадия 1) следовал второй раунд редактирования для вставки hSERPINA1 в локус альбумина мыши (стадия 2). ssAAV и

ЛНЧ, тестируемые в этом примере, получали и доставляли мышам, как описано в примере 1, а именно, самцам мышей NSG-PiZ (группы А, В и С) и самцам мышей C57Bl/6 (группа D) (Jackson Laboratory). Мыши NSG-PiZ представляют собой трансгенных мышей, имеющих копии варианта SERPINA1 PiZ человека (Glu342Lys) в иммунодефицитном окружении NOD scid gamma (NSG).

На стадии 1 этого эксперимента мышам вводили дозу ЛНЧ, несущих мРНК Cas9 и орРНК G000409, нацеленную на трансген hSERPINA1, при 0,3 мг/кг (по отношению к общему содержанию РНК-карго). Через две недели после введения дозы на стадии 1 собирали сыворотку для измерения сывороточных уровней hA1AT. Редактирование на стадии 2 этого эксперимента проводили через 3 недели после введения дозы на стадии 1. При введении дозы на стадии 2 мышам со стадии 1 вводили дозу 1 мг/кг (по отношению к общему содержанию РНК-карго) ЛНЧ, несущих мРНК Cas9 и орРНК G000668 (нацеленную на альбумин мыши), вместе с ssAAV, полученным из P00450, при 1e12 вг/мышь. На Фиг. 5А приведены условия редактирования для каждой исследуемой группы в этом эксперименте. Уровни А1АТ человека в сыворотке определяли методом ELISA (Aviva Biosystems, кат. № ОКIA00048) через одну, две и три недели после введения дозы на стадии 2. Через пять недель после введения дозы на стадии 2 животных умерщвляли и собирали ткань печени и сыворотку для анализа редактирования и сывороточной экспрессии hA1AT, соответственно.

На Фиг. 5В и в таблице 7 проиллюстрировано образование инделей в варианте hSERPINA1 PiZ, который был мишенью на стадии 1. На Фиг. 5С и в таблице 7 проиллюстрировано образование инделей в локусе альбумина, который был мишенью на стадии 2. На Фиг. 5D и в таблице 8 проиллюстрированы уровни белка hA1AT в сыворотке в разные моменты времени, измеренные методом ELISA, а также уровни hA1AT, измеренные в человеческой плазме.

Таблица 7 - Образование инделей в hSERPINA1 и

Группа обработки	hSERPINA1			mAlbumin		
	Среднее редактирование, %	СО	Образцы (n)	Среднее редактирование, %	СО	Образцы (n)
А	0,1	0,1	4	0,1	0,0	4
В	45,9	4,4	5	65,2	3,0	5
С	32,0	3,5	5	52,9	4,0	5
Д	0,7	0,2	5	40,1	2,3	5

Таблица 8 - Уровни hA1AT в сыворотке

Группа обработки	Тип данных	2 неделя	4 неделя	5 неделя	6 неделя
Группа А	Среднее значение (мкг/мл)	2406,575	1903,775	2321,094	882,2813
	СО	348,6477	426,2463	491,8094	228,3315
	Образцы (n)	4	4	4	4
Группа В	Среднее значение (мкг/мл)	21,3279	18,94045	21,36955	14,82225
	СО	5,729652	6,187462	9,180648	3,996221
	Образцы (n)	5	5	5	5
Группа С	Среднее значение (мкг/мл)	17,8477	977,2608	1845,197	1938,48
	СО	3,154736	116,7203	385,4366	572,3113
	Образцы (n)	5	5	5	5
Группа D	Среднее значение (мкг/мл)	Н/Д	1871,738	3861,613	2815,315
	СО	Н/Д	126,3939	426,7188	463,9772
	Образцы (n)	Н/Д	5	5	5
Плазма человека	Среднее значение (мкг/мл)	3816,88			
	СО	141,2429			
	Образцы (n)	3			

Пример 6 - In vitro скрининг двунаправленной конструкции по целевым сайтам в первичных гепатоцитах мышей с применением различных дгРНК или огРНК

В эксперименте, описанном в этом примере, тестировали вставку двунаправленной

конструкции ssAAV (P00415) на панели целевых сайтов, используя 41 разных двойных гидовых РНК (дгРНК) или 4 одинарных гидовых РНК (огРНК), нацеленных на интрон 1 мышинового альбумина, в первичных гепатоцитах мышей (ПГМ).

Конструкцию ssAAV (P00415) и материалы для доставки MessengerMAX или ЛНЧ, тестируемые в этом примере, получали и доставляли в ПГМ, как описано в примере 1, с AAV при $МЗ 1e5$. После обработки выделенную геномную ДНК и клеточную среду собирали для анализа редактирования и экспрессии трансгена, соответственно. Репортерный вектор содержал ОРС NanoLuc (помимо ЗФБ), который можно измерить с помощью регистрации флуоресценции люциферазы, как описано в примере 1, которая отображена на графике на Фиг. 6 в виде относительных единиц люциферазы («ОЕЛ»). Схематическое изображение тестируемого вектора представлено на Фиг. 1А. Протестированные дгРНК проиллюстрированы на Фиг. 6 с использованием сокращенных обозначений для тех, которые перечислены в таблице 15 (например, опущены первые нули, например, «CR5545» соответствует «CR005545» в таблице 15). Определенные дгРНК имеют соответствующие огРНК, указанные в скобках (например, G551 представляет собой огРНК, которая содержит сгРНК и трРНК из дгРНК CR5542). Конструкция огРНК не протестирована на Фиг. 6.

Как проиллюстрировано на Фиг. 6 и в таблице 32, были обнаружены различные уровни экспрессии.

Определенные дгРНК, которые приводили к высокой экспрессии трансгена (например, CR5574, CR5580, CR5576 и CR5579), тестировали в виде огРНК в отношении их способности вставлять hSERPINA1 в сайт интрона 1 мышинового альбумина в ПГМ. В частности, дгРНК CR5574, дгРНК CR5580, дгРНК CR5576 и дгРНК CR5579 соответствуют огРНК G013018, огРНК G013018, огРНК G667 и огРНК G670, соответственно. В ПГМ доставляли 50 нг или 100 нг мРНК Cas9 и 15 нМ или 30 нМ каждой огРНК. Данные на Фиг. 7 отображены на графике в виде ОЕЛ, нормализованных к CellTiter-Glo® (СТГ). Протестированные огРНК проиллюстрированы на Фиг. 7 и дополнительно описаны в таблице 11. Как проиллюстрировано на Фиг. 7 и в таблице 33, были обнаружены различные уровни экспрессии.

Таблица 32 - Экспрессия NanoLuc с AAV-P00415

Направляющая	PMH AAV-P00415	
	Среднее значение, люцифераза (ОЕЛ)	Ст. откл., люцифераза (ОЕЛ)
AAV	47500	10170
AAV	52235	24895
AAV	80570	46130
CR5545	415850	246450
CR5546	565550	34150

CR5547	432750	36050
CR5548	445900	30100
CR5549	993100	301900
CR5550	1658000	68000
CR5551	1587500	226500
CR5552	1946000	277000
CR5556	890600	118400
CR5559	1302000	49000
CR5564	874000	248000
CR5565	411050	256550
CR5566	286350	83650
CR5567	778900	72000
CR5568	1590500	56500
CR5569	1417000	390000
CR5570	838200	150900
CR5571	577800	170200
CR5574	3797000	25000
CR5577	1001550	99450
CR5580	3655500	803500
AAV	47500	10170
AAV	52200	24895
AAV	80600	46130
CR5542 (G551)	367000	300
CR5561 (G552)	982000	303350
CR5575 (G553)	1740000	186500
CR5560 (G554)	1950000	128500
CR5543 (G555)	1520000	59500
CR5578 (G666)	2460000	1000
CR5576 (G667)	1940000	197000
CR5562 (G668)	2510000	876000
CR5563 (G669)	1190000	310550
CR5579 (G670)	4600000	496500
CR5540 (G11722)	712000	35550
CR5573 (G11723)	2320000	500500

CR5541 (G11724)	176000	1150
CR5544 (G11725)	357000	72400
CR5553 (G11726)	374000	93450
CR5554 (G11727)	913000	455500
CR5555 (G11728)	585000	13200
CR5557 (G11729)	1080000	97200
CR5558 (G11730)	1820000	277000
CR5572 (G11731)	999000	135650

Таблица 33: Вставка mAlbumin SERPINA1

Направляющая	Концентрация	NanoLuc/CTG
	AAAV-P00415	12,481248
G013018	100 нг/30 нМ	379,68072
	50 нг/15 нМ	428,03358
G013019	100 нг/30 нМ	750,48285
	50 нг/15 нМ	703,22584
G000670	100 нг/30 нМ	531,21772
	50 нг/15 нМ	440,83152
G000667	100 нг/30 нМ	664,4492
	50 нг/15 нМ	302,77669

Таблица 15. Гидовая дгРНК альбумина мыши и профиль модификации

ID направляющей	Направляющая последовательность	SEQ ID	Полная последовательность	SEQ ID	Геномные координаты
CR005540	UGCUUGU AUUUUUC UAGUAA	1133	UGCUUGUAU UUUUCUAGU AAGUUUUAG AGCUAUGCU GUUUUG	1153	xp5:90461039- 90461059
CR005541	UUUUUCU AGUAAUG GAAGCC	1134	UUUUUCUAG UAAUGGAAG CCGUUUUAG AGCUAUGCU GUUUUG	1154	xp5:90461047- 90461067

CR005542	AUUUGCA UCUGAGA ACCCUU	1135	AUUUGCAUC UGAGAACCC UUGUUUUAG AGCUAUGCU GUUUUG	1155	xp5:90461148- 90461168
CR005543	UGCAUCU GAGAACC CUUAGG	1136	UGCAUCUGA GAACCCUUA GGGUUUUAG AGCUAUGCU GUUUUG	1156	xp5:90461151- 90461171
CR005544	UUAUAUU AUUGAUA UAUUUU	1137	UUAUAUUAU UGAUAUAUU UUGUUUUAG AGCUAUGCU GUUUUG	1157	xp5:90461174- 90461194
CR005553	GCACAGA UAUAAAC ACUUA	1138	GCACAGUA UAAACACUU AAGUUUUAG AGCUAUGCU GUUUUG	1158	xp5:90461480- 90461500
CR005554	CACAGAU AUAACA CUAAC	1139	CACAGUAU AAACACUUA ACGUUUUAG AGCUAUGCU GUUUUG	1159	xp5:90461481- 90461501
CR005555	GGUUUUA AAAUA UAAUGU	1140	GGUUUAAA AAUAUAU GUGUUUUAG AGCUAUGCU GUUUUG	1160	xp5:90461502- 90461522
CR005557	UCAGAUU UCCUGU AACGAU	1141	UCAGAUUUU CCUGUAACG AUGUUUUAG AGCUAUGCU	1161	xp5:90461572- 90461592

			GUUUUG		
CR005558	CAGAUUU UCCUGUA ACGAUC	1142	CAGAUUUUC CUGUAACGA UCGUUUUAG AGCUAUGCU GUUUUG	1162	xp5:90461573- 90461593
CR005560	GAUCGGG AACUGGC AUCUUC	1143	GAUCGGGAA CUGGCAUCU UCGUUUUAG AGCUAUGCU GUUUUG	1163	xp5:90461589- 90461609
CR005561	AUCGGGA ACUGGCA UCUUCA	1144	AUCGGGAAC UGGCAUCUU CAGUUUUAG AGCUAUGCU GUUUUG	1164	xp5:90461590- 90461610
CR005562	GCAUCUU CAGGGAG UAGCUU	1145	GCAUCUUCA GGGAGUAGC UUGUUUUAG AGCUAUGCU GUUUUG	1165	xp5:90461601- 90461621
CR005563	CAAUCUU UAAAUAU GUUGUG	1146	CAAUCUUUA AAUAUGUUG UGGUUUUAG AGCUAUGCU GUUUUG	1166	xp5:90461674- 90461694
CR005572	CAAUGGU AAAUAAG AAAUAA	1147	CAAUGGUAA AUAAGAAU AAGUUUUAG AGCUAUGCU GUUUUG	1167	xp5:90461408- 90461428

CR005573	GUAAAUA UCUACUA AGACAA	1148	GUAAAUAUC UACUAAGAC AAGUUUUAG AGCUAUGCU GUUUUG	1168	xp5:90461425- 90461445
CR005575	GUUACAG GAAAauc UGAAGG	1149	GUUACAGGA AAAUCUGAA GGGUUUUAG AGCUAUGCU GUUUUG	1169	xp5:90461569- 90461589
CR005576	AUCGUUA CAGGAAA AUCUGA	1150	AUCGUUACA GGAAAUCU GAGUUUUAG AGCUAUGCU GUUUUG	1170	xp5:90461572- 90461592
CR005578	CACUCUU GUCUGUG GAAACA	1151	CACUCUUGU CUGUGGAAA CAGUUUUAG AGCUAUGCU GUUUUG	1171	xp5:90461709- 90461729
CR005579	UCACUCU UGUCUGU GGAAAC	1152	UCACUCUUG UCUGUGGAA ACGUUUUAG AGCUAUGCU GUUUUG	1172	xp5:90461710- 90461730

Пример 7 - in vitro скрининг двунаправленной конструкции по целевым сайтам в первичных гепатоцитах крыс

В эксперименте, описанном в этом примере, тестировали вставку двунаправленной конструкции ssAAV (P00415) на панели целевых сайтов, используя 32 разных гРНК, нацеленных на интрон 1 крысиного альбумина, в первичных гепатоцитах крыс (ПГК).

Конструкцию ssAAV (P00415) и материалы для доставки MessengerMAX, тестируемые в этом примере, получали и доставляли в ПГК, как описано в примере 1, с AAV при МЗ 1e6, 100 нг мРНК Cas9 и огРНК в концентрации 25 нМ. После обработки выделенную геномную ДНК и клеточную среду собирали для анализа редактирования и экспрессии трансгена, соответственно. Репортерный вектор содержал ОРС NanoLuc (помимо ЗФБ), который можно измерить с помощью регистрации флуоресценции

люциферазы, как описано в примере 1. Данные отображены на графике на Фиг. 8 в виде относительных единиц люциферазы, нормализованных к CellTiter-Glo® («NanoLuc/CTG»). Схематическое изображение тестируемого вектора представлено на Фиг. 1А.

Как проиллюстрировано на Фиг. 8, были обнаружены различные уровни редактирования (образования инделей). Однако, высокие уровни редактирования не обязательно приводят к более эффективной экспрессии трансгенов.

Вставку двунаправленной конструкции ssAAV (P00415) в различных целевых сайтах с применением конкретных гРНК, протестированную на Фиг. 8, оценивали в некотором диапазоне концентраций (Cas9: 3,125 нг, 6,25 нг, 12,5 нг, 25 нг, 50 нг или 100 нг; огРНК: 0,78 нМ, 1,56 нМ, 3,125 нМ, 6,25 нМ, 12,5 нМ или 25 нМ). Как проиллюстрировано на Фиг. 9, вставка двунаправленной конструкции ssAAV (P00415) в локусе альбумина крысы является дозозависимой, что означает, что повышение дозы Cas9/огРНК модулирует уровни вставки.

Таблица 16. Гидовая дгРНК альбумина крысы и профиль модификации

ID напра вляю щей	Полная последовательность	SEQ ID NO:	Модифицированная полная последовательность	SEQ ID NO:
G0157 40	ACUCUUGUCUGUGGGAA UGGGUUUUAGAGCUAGA AAUAGCAAGUUAAAUA AGGCUAGUCCGUUAUCA ACUUGAAAAAGUGGCAC CGAGUCGGUGCUUUU	1173	mA*mC*mU*CUUGUCUGUG GGAAUGGGUUUUAGAmGm CmUmAmGmAmAmUmAm GmCAAGUUAAAUAAGGCU AGUCCGUUAUCAmAmCmU mUmGmAmAmAmAmGmU mGmGmCmAmCmCmGmAmG mUmCmGmGmUmGmCmU*m U*mU*mU	1198
G0157 31	UCCAAUCGCUACAGGAA AAUGUUUUAGAGCUAGA AAUAGCAAGUUAAAUA AGGCUAGUCCGUUAUCA ACUUGAAAAAGUGGCAC CGAGUCGGUGCUUUU	1174	mU*mC*mC*AAUCGCUACAG GAAAUGUUUUAGAmGmC mUmAmGmAmAmUmAmG mCAAGUUAAAUAAGGCUA GUCCGUUAUCAmAmCmUm UmGmAmAmAmAmGmUm GmGmCmAmCmCmGmAmGm UmCmGmGmUmGmCmU*mU* mU*mU	1199

G0157 33	UUAGUAUAGCUAGGUAG AGCGUUUUAGAGCUAGA AAUAGCAAGUUAAAAUA AGGCUAGUCCGUUAUCA ACUUGAAAAAGUGGCAC CGAGUCGGUGCUUUU	1175	mU*mU*mA*GUAUAGCUAG GUAGAGCGUUUUAGAmGm CmUmAmGmAmAmUmAm GmCAAGUUAAAAUAAGGCU AGUCCGUUAUCAmAmCmU mUmGmAmAmAmAmGmU mGmGmCmAmCmCmGmAmG mUmCmGmGmUmGmCmU*m U*mU*mU	1200
G0175 41	ACUCCGAUGACAAUAAU GGGGUUUUAGAGCUAGA AAUAGCAAGUUAAAAUA AGGCUAGUCCGUUAUCA ACUUGAAAAAGUGGCAC CGAGUCGGUGCUUUU	1176	mA*mC*mU*CCGAUGACAA UAAUGGGGUUUUAGAmGm CmUmAmGmAmAmUmAm GmCAAGUUAAAAUAAGGCU AGUCCGUUAUCAmAmCmU mUmGmAmAmAmAmGmU mGmGmCmAmCmCmGmAmG mUmCmGmGmUmGmCmU*m U*mU*mU	1201
G0157 23	GCGAUCUCACUCUUGUC UGUGUUUUAGAGCUAGA AAUAGCAAGUUAAAAUA AGGCUAGUCCGUUAUCA ACUUGAAAAAGUGGCAC CGAGUCGGUGCUUUU	1177	mG*mC*mG*AUCUCACUCUU GUCUGUGUUUUAGAmGmC mUmAmGmAmAmUmAmG mCAAGUUAAAAUAAGGCUA GUCCGUUAUCAmAmCmUm UmGmAmAmAmAmGmUm GmGmCmAmCmCmGmAmGm UmCmGmGmUmGmCmU*mU* mU*mU	1202
G0157 11	GAUUUCCUGUAGCGAU UGGGUUUUAGAGCUAGA AAUAGCAAGUUAAAAUA AGGCUAGUCCGUUAUCA ACUUGAAAAAGUGGCAC CGAGUCGGUGCUUUU	1178	mG*mA*mU*UUUCCUGUAG CGAUUGGGUUUUAGAmGm CmUmAmGmAmAmUmAm GmCAAGUUAAAAUAAGGCU AGUCCGUUAUCAmAmCmU mUmGmAmAmAmAmGmU mGmGmCmAmCmCmGmAmG mUmCmGmGmUmGmCmU*m	1203

			U*mU*mU	
G0157 22	AUUCGUAAAAUUACUAA UACGUUUUAGAGCUAGA AAUAGCAAGUUAAAAUA AGGCUAGUCCGUUAUCA ACUUGAAAAAGUGGCAC CGAGUCGGUGCUUUU	1179	mA*mU*mU*CGUAAAAUUA CUAAUACGUUUUAGAmGmC mUmAmGmAmAmAmUmAmG mCAAGUUAAAAUAAGGCUA GUCCGUUAUCAmAmCmUm UmGmAmAmAmAmAmGmUm GmGmCmAmCmCmGmAmGm UmCmGmGmUmGmCmU*mU* mU*mU	1204
G0157 37	AGUCCCCCAUUAUUGU CAUGUUUUAGAGCUAGA AAUAGCAAGUUAAAAUA AGGCUAGUCCGUUAUCA ACUUGAAAAAGUGGCAC CGAGUCGGUGCUUUU	1180	mA*mG*mU*CCCCCAUUAU UGUCAUGUUUUAGAmGmC mUmAmGmAmAmAmUmAmG mCAAGUUAAAAUAAGGCUA GUCCGUUAUCAmAmCmUm UmGmAmAmAmAmAmGmUm GmGmCmAmCmCmGmAmGm UmCmGmGmUmGmCmU*mU* mU*mU	1205
G0157 28	GCUGAACUCACUAGUUU CAAGUUUUAGAGCUAGA AAUAGCAAGUUAAAAUA AGGCUAGUCCGUUAUCA ACUUGAAAAAGUGGCAC CGAGUCGGUGCUUUU	1181	mG*mC*mU*GAACUCACUA GUUUCAAGUUUUAGAmGm CmUmAmGmAmAmAmUmAm GmCAAGUUAAAAUAAGGCU AGUCCGUUAUCAmAmCmU mUmGmAmAmAmAmAmGmU mGmGmCmAmCmCmGmAmG mUmCmGmGmUmGmCmU*m U*mU*mU	1206
G0157 17	GAUUGGAGGCUGGGAAC UUCGUUUUAGAGCUAGA AAUAGCAAGUUAAAAUA AGGCUAGUCCGUUAUCA ACUUGAAAAAGUGGCAC CGAGUCGGUGCUUUU	1182	mG*mA*mU*UGGAGGCUGG GAACUUCGUUUUAGAmGmC mUmAmGmAmAmAmUmAmG mCAAGUUAAAAUAAGGCUA GUCCGUUAUCAmAmCmUm UmGmAmAmAmAmAmGmUm GmGmCmAmCmCmGmAmGm	1207

			UmCmGmGmUmGmCmU*mU* mU*mU	
G0157 35	UACAUUAUAUAACCAC AUAGUUUUAGAGCUAGA AAUAGCAAGUUAAAAUA AGGCUAGUCCGUUAUCA ACUUGAAAAAGUGGCAC CGAGUCGGUGCUUUU	1183	mU*mA*mC*AUUAAUAUAA CCACAUAGUUUUAGAmGmC mUmAmGmAmAmAmUmAmG mCAAGUUAAAAUAAGGCUA GUCCGUUAUCAmAmCmUm UmGmAmAmAmAmAmGmUm GmGmCmAmCmCmGmAmGm UmCmGmGmUmGmCmU*mU* mU*mU	1208
G0157 27	AAACUCUGAAUGUAGUC GAAGUUUUAGAGCUAGA AAUAGCAAGUUAAAAUA AGGCUAGUCCGUUAUCA ACUUGAAAAAGUGGCAC CGAGUCGGUGCUUUU	1184	mA*mA*mA*CUCUGAAUGU AGUCGAAGUUUUAGAmGm CmUmAmGmAmAmAmUmAm GmCAAGUUAAAAUAAGGCU AGUCCGUUAUCAmAmCmU mUmGmAmAmAmAmAmGmU mGmGmCmAmCmCmGmAmG mUmCmGmGmUmGmCmU*m U*mU*mU	1209
G0157 16	AUGACUGAAACAUUCCG UCUGUUUUAGAGCUAGA AAUAGCAAGUUAAAAUA AGGCUAGUCCGUUAUCA ACUUGAAAAAGUGGCAC CGAGUCGGUGCUUUU	1185	mA*mU*mG*ACUGAAACAU UCCGUCUGUUUUAGAmGmC mUmAmGmAmAmAmUmAmG mCAAGUUAAAAUAAGGCUA GUCCGUUAUCAmAmCmUm UmGmAmAmAmAmAmGmUm GmGmCmAmCmCmGmAmGm UmCmGmGmUmGmCmU*mU* mU*mU	1210
G0157 29	GUGAUUUUAUCAUCAC CAAGUUUUAGAGCUAGA AAUAGCAAGUUAAAAUA AGGCUAGUCCGUUAUCA ACUUGAAAAAGUGGCAC CGAGUCGGUGCUUUU	1186	mG*mU*mG*AUAUUAAUCA UCACCAAGUUUUAGAmGmC mUmAmGmAmAmAmUmAmG mCAAGUUAAAAUAAGGCUA GUCCGUUAUCAmAmCmUm UmGmAmAmAmAmAmGmUm	1211

			GmGmCmAmCmCmGmAmGm UmCmGmGmUmGmCmU*mU* mU*mU	
G0157 30	AACUCCGAUGACAAUAA UGGGUUUUAGAGCUAGA AAUAGCAAGUUAAAAUA AGGCUAGUCCGUUAUCA ACUUGAAAAAGUGGCAC CGAGUCGGUGCUUUU	1187	mA*mA*mC*UCCGAUGACA AUA AUGGGUUUUAGAmGm CmUmAmGmAmAmUmAm GmCAAGUUAAAAUAAGGCU AGUCCGUUAUCAmAmCmU mUmGmAmAmAmAmGmU mGmGmCmAmCmCmGmAmG mUmCmGmGmUmGmCmU*m U*mU*mU	1212
G0157 34	CUUUGCAUUCAAACCA AGAGUUUUAGAGCUAGA AAUAGCAAGUUAAAAUA AGGCUAGUCCGUUAUCA ACUUGAAAAAGUGGCAC CGAGUCGGUGCUUUU	1188	mC*mU*mU*UGCAUUCAAA CCCAAGAGUUUUAGAmGmC mUmAmGmAmAmUmAmG mCAAGUUAAAAUAAGGCUA GUCCGUUAUCAmAmCmUm UmGmAmAmAmAmGmUm GmGmCmAmCmCmGmAmGm UmCmGmGmUmGmCmU*mU* mU*mU	1213
G0157 26	GAUAACUCCGAUGACAA UAAGUUUUAGAGCUAGA AAUAGCAAGUUAAAAUA AGGCUAGUCCGUUAUCA ACUUGAAAAAGUGGCAC CGAGUCGGUGCUUUU	1189	mG*mA*mU*AACUCCGAUG ACAAUAAGUUUUAGAmGm CmUmAmGmAmAmUmAm GmCAAGUUAAAAUAAGGCU AGUCCGUUAUCAmAmCmU mUmGmAmAmAmAmGmU mGmGmCmAmCmCmGmAmG mUmCmGmGmUmGmCmU*m U*mU*mU	1214
G0157 36	AUGUUUGUAAAUGUCUA CUAGUUUUAGAGCUAGA AAUAGCAAGUUAAAAUA AGGCUAGUCCGUUAUCA ACUUGAAAAAGUGGCAC	1190	mA*mU*mG*UUUGUAAAUG UCUACUAGUUUUAGAmGmC mUmAmGmAmAmUmAmG mCAAGUUAAAAUAAGGCUA GUCCGUUAUCAmAmCmUm	1215

	CGAGUCGGUGCUUUU		UmGmAmAmAmAmAmGmUm GmGmCmAmCmCmGmAmGm UmCmGmGmUmGmCmU*mU* mU*mU	
G0157 32	UGCAUCUGAGAAUCCUU AUGGUUUUAGAGCUAGA AAUAGCAAGUUAAAAUA AGGCUAGUCCGUUAUCA ACUUGAAAAAGUGGCAC CGAGUCGGUGCUUUU	1191	mU*mG*mC*AUCUGAGAAU CCUUAUGGUUUUAGAmGmC mUmAmGmAmAmAmUmAmG mCAAGUUAAAAUAAGGCUA GUCCGUUAUCAmAmCmUm UmGmAmAmAmAmAmGmUm GmGmCmAmCmCmGmAmGm UmCmGmGmUmGmCmU*mU* mU*mU	1216
G0157 19	UGACUGAAACAUCCGU CUUGUUUUAGAGCUAGA AAUAGCAAGUUAAAAUA AGGCUAGUCCGUUAUCA ACUUGAAAAAGUGGCAC CGAGUCGGUGCUUUU	1192	mU*mG*mA*CUGAAACA CCGUCUUGUUUUAGAmGmC mUmAmGmAmAmAmUmAmG mCAAGUUAAAAUAAGGCUA GUCCGUUAUCAmAmCmUm UmGmAmAmAmAmAmGmUm GmGmCmAmCmCmGmAmGm UmCmGmGmUmGmCmU*mU* mU*mU	1217
G0157 20	UCCUGUAGCGAUUGGAG GCUGUUUUAGAGCUAGA AAUAGCAAGUUAAAAUA AGGCUAGUCCGUUAUCA ACUUGAAAAAGUGGCAC CGAGUCGGUGCUUUU	1193	mU*mC*mC*UGUAGCGAUU GGAGGCUGUUUUAGAmGm CmUmAmGmAmAmAmUmAm GmCAAGUUAAAAUAAGGCU AGUCCGUUAUCAmAmCmU mUmGmAmAmAmAmAmGmU mGmGmCmAmCmCmGmAmG mUmCmGmGmUmGmCmU*m U*mU*mU	1218
G0157 18	UAUGCGUGUUUAGUAUA GCUGUUUUAGAGCUAGA AAUAGCAAGUUAAAAUA AGGCUAGUCCGUUAUCA	1194	mU*mA*mU*GCGUGUUUAG UAUAGCUGUUUUAGAmGm CmUmAmGmAmAmAmUmAm GmCAAGUUAAAAUAAGGCU	1219

	ACUUGAAAAAGUGGCAC CGAGUCGGUGCUUUU		AGUCCGUUAUCAmAmCmU mUmGmAmAmAmAmAmGmU mGmGmCmAmCmCmGmAmG mUmCmGmGmUmGmCmU*m U*mU*mU	
G0157 39	ACUUUUAUUUUUCGUAG UAAGUUUUAGAGCUAGA AAUAGCAAGUUAAAAUA AGGCUAGUCCGUUAUCA ACUUGAAAAAGUGGCAC CGAGUCGGUGCUUUU	1195	mA*mC*mU*UUUAUUUUUC GUAGUAAGUUUUAGAmGm CmUmAmGmAmAmUmAm GmCAAGUUAAAAUAAGGCU AGUCCGUUAUCAmAmCmU mUmGmAmAmAmAmAmGmU mGmGmCmAmCmCmGmAmG mUmCmGmGmUmGmCmU*m U*mU*mU	1220
G0157 24	UGUAUUAGUAAUUUUAC GAAGUUUUAGAGCUAGA AAUAGCAAGUUAAAAUA AGGCUAGUCCGUUAUCA ACUUGAAAAAGUGGCAC CGAGUCGGUGCUUUU	1196	mU*mG*mU*AUUAGUAAUU UUACGAAGUUUUAGAmGm CmUmAmGmAmAmUmAm GmCAAGUUAAAAUAAGGCU AGUCCGUUAUCAmAmCmU mUmGmAmAmAmAmAmGmU mGmGmCmAmCmCmGmAmG mUmCmGmGmUmGmCmU*m U*mU*mU	1221
G0157 38	UUAAGUAAUUUUGAAAU ACCGUUUUAGAGCUAGA AAUAGCAAGUUAAAAUA AGGCUAGUCCGUUAUCA ACUUGAAAAAGUGGCAC CGAGUCGGUGCUUUU	1197	mU*mU*mA*AGUAAUUUUG AAAUACCGUUUUAGAmGmC mUmAmGmAmAmUmAmG mCAAGUUAAAAUAAGGCUA GUCCGUUAUCAmAmCmUm UmGmAmAmAmAmAmGmUm GmGmCmAmCmCmGmAmGm UmCmGmGmUmGmCmU*mU* mU*mU	1222
G0157 13	AUAACUCCGAUGACAAU AAUGUUUUAGAGCUAGA AAUAGCAAGUUAAAAUA	1229	mA*mU*mA*ACUCCGAUGA CAAUAAUGUUUUAGAmGm CmUmAmGmAmAmUmAm	1223

	AGGCUAGUCCGUUAUCA ACUUGAAAAAGUGGCAC CGAGUCGGUGCUUUU		GmCAAGUUAAAAUAAGGCU AGUCCGUUAUCAmAmCmU mUmGmAmAmAmAmAmGmU mGmGmCmAmCmCmGmAmG mUmCmGmGmUmGmCmU*m U*mU*mU	
G0157 25	UAACUCCGAUGACAAUA AUGGUUUUAGAGCUAGA AAUAGCAAGUUAAAAUA AGGCUAGUCCGUUAUCA ACUUGAAAAAGUGGCAC CGAGUCGGUGCUUUU	1230	mU*mA*mA*CUCCGAUGAC AAUAAUGGUUUUAGAmGm CmUmAmGmAmAmUmAm GmCAAGUUAAAAUAAGGCU AGUCCGUUAUCAmAmCmU mUmGmAmAmAmAmAmGmU mGmGmCmAmCmCmGmAmG mUmCmGmGmUmGmCmU*m U*mU*mU	1224
G0157 21	UUUUCGUAGUAACGGAA GCCGUUUUAGAGCUAGA AAUAGCAAGUUAAAAUA AGGCUAGUCCGUUAUCA ACUUGAAAAAGUGGCAC CGAGUCGGUGCUUUU	1231	mU*mU*mU*UCGUAGUAAC GGAAGCCGUUUUAGAmGmC mUmAmGmAmAmAmUmAmG mCAAGUUAAAAUAAGGCUA GUCCGUUAUCAmAmCmUm UmGmAmAmAmAmAmGmUm GmGmCmAmCmCmGmAmGm UmCmGmGmUmGmCmU*mU* mU*mU	1225
G0157 14	UUCCUGUAGCGAUUGGA GGCGUUUUAGAGCUAGA AAUAGCAAGUUAAAAUA AGGCUAGUCCGUUAUCA ACUUGAAAAAGUGGCAC CGAGUCGGUGCUUUU	1232	mU*mU*mC*CUGUAGCGAU UGGAGGCGUUUUAGAmGm CmUmAmGmAmAmUmAm GmCAAGUUAAAAUAAGGCU AGUCCGUUAUCAmAmCmU mUmGmAmAmAmAmAmGmU mGmGmCmAmCmCmGmAmG mUmCmGmGmUmGmCmU*m U*mU*mU	1226
G0157 15	UCCCAGCCUCCAAUCGC UACGUUUUAGAGCUAGA	1233	mU*mC*mC*CAGCCUCCAAU CGCUACGUUUUAGAmGmCm	1227

	AAUAGCAAGUAAAAUA AGGCUAGUCCGUUAUCA ACUUGAAAAAGUGGCAC CGAGUCGGUGCUUUU		UmAmGmAmAmAmUmAmGm CAAGUAAAAUAAGGCUAG UCCGUUAUCAmAmCmUmU mGmAmAmAmAmAmGmUmG mGmCmAmCmCmGmAmGmU mCmGmGmUmGmCmU*mU*m U*mU	
G0157 12	UCCGAUUUCCUGUAGC GAUGUUUUAGAGCUAGA AAUAGCAAGUAAAAUA AGGCUAGUCCGUUAUCA ACUUGAAAAAGUGGCAC CGAGUCGGUGCUUUU	1234	mU*mC*mC*GAUUUCCUG UAGCGAUGUUUUAGAmGm CmUmAmGmAmAmAmUmAm GmCAAGUAAAAUAAGGCU AGUCCGUUAUCAmAmCmU mUmGmAmAmAmAmAmGmU mGmGmCmAmCmCmGmAmG mUmCmGmGmUmGmCmU*m U*mU*mU	1228

Пример 8 - In vitro скрининг двунаправленной конструкции по целевым сайтам в первичных гепатоцитах яванских макаков с применением различных гРНК

В эксперименте, описанном в этом примере, тестировали вставку двунаправленной конструкции ssAAV (P00415) на панели целевых сайтов, используя 34 разные гРНК, нацеленные на интрон 1 альбумина яванского макака («яв. м.»), в первичных гепатоцитах яванских макаков (ПГЯ). Исследование с использованием 34 разных гРНК проводили дважды, чтобы оценить вариабельность между отдельными экспериментами.

Материалы для доставки ssAAV и липидных пакетов, тестируемых в этом примере, получали и доставляли в ПГЯ, как описано в примере 1. После обработки выделенную геномную ДНК и клеточную среду собирали для анализа редактирования и экспрессии трансгена, соответственно. Каждый из векторов (полученных из плазмиды P00415) содержал репортер, который можно измерить с помощью регистрации флуоресценции люциферазы, как описано в примере 1. В этом примере AAV-векторы содержали OPC NanoLuc (в дополнение к ЗФБ). Каждая из тестируемых гРНК и соответствующие данные по редактированию и экспрессии трансгенов приведены в таблице 17 и таблице 18. Экспрессия трансгенов измерена в ОЕЛ, нормализованных к CellTiter-Glo® (CTG).

Как показано в таблице 17, были обнаружены различные уровни редактирования для каждой из исследуемых комбинаций. Однако, как показано в таблице 18, высокие уровни редактирования необязательно приводили к более эффективной экспрессии трансгенов, что указывает на слабую корреляцию между редактированием и вставкой/экспрессией двунаправленных конструкций в ПГЯ.

Таблица 17: Данные по редактированию интрона 1 альбумина для оГРНК, доставленных в первичные гепатоциты яванского макака

ID направляющей	Эксп. № 1 Средн. % редактирования	Эксп. № 2 Средн. % редактирования	Среднее по эксп. № 1 и № 2
G009870	28,8	40,5	34,65
G009848	41,9	35,2	38,55
G009864	38,4	49,0	43,7
G009874	30,2	39,6	34,9
G009869	32,3	26,2	29,25
G009860	42,0	30,8	36,4
G009844	37,3	38,4	37,85
G009849	48,8	51,2	50
G009845	36,2	53,8	45
G009859	36,1	29,2	32,65
G009854	40,4	42,3	41,35
G009862	34,9	32,3	33,6
G009856	21,2	36,0	28,6
G009846	43,8	41,7	42,75
G009847	51,8	61,6	56,7
G009855	39,9	39,4	39,65
G009852	41,9	42,0	41,95
G009851	40,9	23,6	32,25
G009865	36,9	36,5	36,7
G009872	36,2	34,6	35,4
G009853	53,3	42,2	47,75
G012766	45,7	21,0	33,35
G009873	41,7	43,6	42,65
G009868	27,4	29,2	28,3
G009850	47,7	53,5	50,6
G009861	32,9	27,2	30,05
G009866	33,0	31,3	32,15
G009876	34,1	29,2	31,65
G009875	34,3	34,5	34,4

G009863	59,5	51,7	55,6
G009871	55,8	48,3	52,05
G009857	21,4	22,1	21,75
G009858	15,0	8,6	11,8
G009867	48,2	31,3	39,75

Таблица 18: Данные по экспрессии интрона 1 альбумина для конструкций с использованием различных огРНК, доставленных в первичные гепатоциты яванского макака

ID направляющей	Эксп. №1 Средн. ОЕЛ/СТГ	Эксп. №1 Стд. откл. ОЕЛ/СТГ	Эксп. №2 Средн. ОЕЛ/СТГ	Эксп. №2 Стд. откл. ОЕЛ/СТГ	Среднее по эксп. № 1 и № 2
G009870	216,49	15,83	250,72	52,47	233,60
G009848	320,06	90,30	241,93	58,04	281,00
G009864	282,52	30,63	220,90	4,65	251,71
G009874	209,18	46,68	217,59	17,69	213,38
G009869	248,83	40,53	213,25	31,06	231,04
G009860	200,75	2,50	197,89	74,55	199,32
G009844	246,67	54,60	194,37	59,12	220,52
G009849	240,66	47,60	193,26	17,24	216,96
G009845	183,30	44,92	188,04	58,68	185,67
G009859	215,47	21,27	187,92	38,90	201,70
G009854	188,52	5,15	184,72	31,34	186,62
G009862	225,87	4,24	182,45	4,39	204,16
G009856	190,20	9,06	178,42	62,26	184,31
G009846	223,93	27,92	177,23	51,96	200,58
G009847	281,44	25,14	170,66	3,16	226,05
G009855	256,16	40,14	169,57	8,00	212,87
G009852	203,79	30,02	167,80	16,90	185,79
G009851	200,23	26,64	167,48	46,06	183,85
G009865	185,17	12,28	167,38	13,01	176,27
G009872	115,79	15,80	144,73	11,44	130,26
G009853	180,41	0,28	141,34	4,00	160,88
G012766	131,47	15,22	139,08	59,22	135,27
G009873	112,77	34,15	136,21	15,88	124,49

G009868	210,02	9,35	133,32	18,70	171,67
G009850	201,10	19,37	132,06	5,45	166,58
G009861	169,03	5,39	124,62	20,05	146,83
G009866	143,57	9,77	124,50	23,00	134,03
G009876	132,26	31,77	120,94	30,00	126,60
G009875	119,64	18,04	113,61	6,52	116,62
G009863	160,89	5,30	108,83	24,78	134,86
G009871	102,92	12,93	102,00	13,68	102,46
G009857	54,05	11,70	63,37	4,00	58,71
G009858	61,50	1,82	60,84	0,17	61,17
G009867	14,14	2,65	12,16	0,25	13,15

Пример 9 - In vivo вставка hSERPINA1 в локус mAlbumin с использованием двунаправленной конструкции, содержащей последовательность P2A

Тестировали эффективность различных двунаправленных конструкций с последовательностью P2A и без нее в облегчении вставки hSERPINA1 в локус альбумина мыши. ssAAV и ЛНЧ, тестируемые в этом примере, получали и доставляли мышам, как описано в примере 1 (n=5 на группу). Сыворотку собирали через 1, 2, 4 и 5 недель после введения дозы для измерения сывороточной экспрессии альфа-1-антитрипсина человека (hA1AT).

Две разные конструкции, P00450 и P00451, доставляли мышам вместе с составом ЛНЧ, содержащим G000670, нацеленную на интрон 1 альбумина. Компоненты и последовательности векторов для конструкций P00450 и P00451 приведены в таблице 19. AAV и ЛНЧ доставляли при 1e12 вг/мышь и 1,0 мг/кг (по отношению к общему содержанию РНК-карго), соответственно. Сывороточные уровни hA1AT проиллюстрированы на Фиг. 10 и в таблице 20 и таблице 21 через 1, 2, 4 и 5 недель после введения дозы. как показано в таблице 20 и таблице 21, включение P2A не обязательно приводит к более эффективной экспрессии трансгена, указывая на то, что hA1AT может экспрессироваться при включении или без включения саморасщепляющегося пептида 2A, такого как P2A.

Таблица 19: Компоненты и последовательности векторов

	Компонент	P00450	P00451
	5' ИКП	(SEQ ID NO: 263)	SEQ ID NO: 263
1-ая ориентация	2A	Н/Д	
	Акцептор сплайсинга	Акцептор сплайсинга альбумина мыши (SEQ ID NO: 264)	SEQ ID NO: 264
	Трансген	SERPINA1 человека	SEQ ID NO: 268

		(SEQ ID NO: 265)	
	Поли-А	SEQ ID NO: 266	SEQ ID NO: 266
2-ая ориентация	Поли-А	SEQ ID NO: 267	SEQ ID NO: 267
	Трансген	SERPINA1 человека (SEQ ID NO: 268)	
	Акцептор сплайсинга	Акцептор сплайсинга альбумина мыши (SEQ ID NO: 269)	SEQ ID NO: 269
	2А	Н/Д	
	3' ИКП	(SEQ ID NO: 270)	SEQ ID NO: 270

Таблица 20: Уровни hA1AT в сыворотке (недели 1 и 2)

Условие	1 неделя			2 неделя		
	Среднее значение (мкг/мл)	СО	Образцы (n)	Среднее значение (мкг/мл)	СО	Образцы (n)
AAV и ЛНЧ (P00450+G000670)	168,92	27,75	2	2499,05	289,49	3
AAV и ЛНЧ (P00451+G000670)	130,90	22,22	5	1175,16	111,65	4
Только AAV (P00450)	0	0	4	0	0	1
Только AAV (P00451)	0	0	4	0	0	1
Носитель	0	0	4	0	0	1
Контроль (партия плазмы человека)	3450,05	334,76	4			

Таблица 21: Уровни hA1AT в сыворотке (недели 3 и 4)

Условие	3 неделя			4 неделя		
	Среднее значение (мкг/мл)	СО	Образцы (n)	Среднее значение (мкг/мл)	СО	Образцы (n)
AAV и ЛНЧ (P00450+G000670)	2620,77	504,64	5	2480,33	317,19	5
AAV и ЛНЧ	1705,83	203,36	5	1562,14	345,42	5

(P00451+G000670)						
Только AAV (P00450)				0	0	5
Только AAV (P00451)				0	0	5
Носитель				0	0	5
Контроль (партия плазмы человека)						

Пример 10 - In vivo нокдаун трансгена hSERPINA1 PiZ и вставка hSERPINA1 в локус mAlbumin

В этом примере оценивали возможность нокдауна трансгена hSERPINA1 и вставки hSERPINA1 в локус альбумина мыши. В эксперименте было две стадии: (1) первый раунд редактирования для нокдауна экспрессии A1AT из вариантного трансгена hSERPINA PiZ (стадия 1); и (2) второй раунд редактирования для вставки hSERPINA1 в локус альбумина мыши (стадия 2). ssAAV и ЛНЧ, тестируемые в этом примере, получали и доставляли самцам мышей NSG-PiZ (группы 1, 2 и 3) (Jackson Laboratory), как описано в примере 1.

На стадии 1 этого эксперимента мышам вводили дозу ЛНЧ, несущих мРНК Cas9 и оgРНК G000409, нацеленную на трансген hSERPINA1, при 0,3 мг/кг (по отношению к общему содержанию РНК-карго) или контрольный носитель. Через две недели после введения дозы на стадии 1 собирали сыворотку для измерения сывороточных уровней hA1AT. Введение дозы на стадии 2 этого эксперимента проводили через 3 недели после введения дозы на стадии 1. При введении дозы на стадии 2 мышам со стадии 1 вводили дозу 1 мг/кг (по отношению к общему содержанию РНК-карго) ЛНЧ, несущих мРНК Cas9 и оgРНК G000668 (нацеленную на альбумин мыши), одних или вместе с ssAAV, полученным из P00450, при 1e12 вг/мышь, а контрольная группа получала только носитель. В таблице 22 приведены условия редактирования каждой исследуемой группы в этом эксперименте. Уровни A1AT человека в сыворотке определяли методом ELISA через одну, две и три недели после введения дозы на стадии 2. Через пять недель после введения дозы на стадии 2 животных умерщвляли и собирали ткань печени и сыворотку для определения уровней сывороточной экспрессии hA1AT.

На Фиг. 11 и в таблице 23 проиллюстрированы уровни белка hA1AT в сыворотке в различные моменты времени, измеренные методом ELISA.

Таблица 22: Условия редактирования для каждой исследуемой группы

Группа обработки	Фон	Стадия 1	Стадия 2
1	NGS-PiZ	Носитель	Носитель
2	NGS-PiZ	G000409	Только G000668
3	NGS-PiZ	G000409	G000668+P00450

Таблица 23 - Уровни hA1AT в сыворотке

Группа обработки	Тип данных	2 неделя	4 неделя	5 неделя	6 неделя	8 неделя
Группа 1	Среднее значение (мкг/мл)	2787,03	1752,09	1188,34	1165,73	882,28
	СО	530,59	479,90	325,73	288,97	228,33
	Образцы (n)	4	4	4	4	4
Группа 2	Среднее значение (мкг/мл)	17,08	17,71	16,58	17,25	14,82
	СО	5,86	6,08	4,88	4,89	3,99
	Образцы (n)	5	5	5	5	5
Группа 3	Среднее значение (мкг/мл)	13,99	1480,69	1465,54	2913,76	1938,48
	СО	3,20	215,35	519,08	619,28	572,31
	Образцы (n)	5	5	5	5	5

Пример 11 - Длительность экспрессии hA1AT in vivo после нокдауна трансгена hSERPINA1 PiZ и вставки hSERPINA1 в локус mAlbumin

В этом примере у обработанных животных оценивали продолжительность экспрессии hA1AT по времени. С этой целью измеряли hA1AT в сыворотке обработанных животных после введения дозы в рамках 15-недельного исследования продолжительности.

В этом примере за первым раундом редактирования для нокдауна экспрессии A1AT из вариантного трансгена hSERPINA PiZ (стадия 1) следовал второй раунд редактирования для вставки hSERPINA1 в локус альбумина мыши (стадия 2). ssAAV, ЛНЧ и контроли, тестируемые в этом эксперименте, получали и доставляли мышам, как описано в примере 1, а именно самцам мышей NSG-PiZ (группы 1, 2, 3, 4, 5 и 6).

На стадии 1 этого эксперимента мышам в группах 2, 3, 4 и 6 вводили дозу ЛНЧ, несущих мРНК Cas9 и орРНК G000409, нацеленную на трансген hSERPINA1, при 0,3

мг/кг (по отношению к общему содержанию РНК-карго). Редактирование на стадии 2 этого эксперимента проводили через 3 недели после введения дозы на стадии 1. При введении дозы на стадии 2 мышам из групп 4, 5 и 6 вводили дозу 1 мг/кг (по отношению к общему содержанию РНК-карго) ЛНЧ, несущих мРНК Cas9 и орРНК G000666 или орРНК G13019 (обе нацелены на альбумин мыши), вместе с ssAAV, полученным из P00450, при 1e12 вг/мышь. В таблице 24 приведены условия редактирования для каждой исследуемой группы в этом эксперименте. Уровни A1AT человека в сыворотке определяли методом ELISA через четыре, восемь и двенадцать недель после введения дозы на стадии 2. Уровни A1AT человека (дикого типа и мутантного) в сыворотке также определяли методом ЖХ-МС/МС через одну, две, четыре, восемь и двенадцать недель после введения дозы на стадии 2. Через двенадцать недель после введения дозы на стадии 2 животных умерщвляли и собирали ткань печени и сыворотку для анализа редактирования и сывороточной экспрессии hA1AT, соответственно.

На Фиг. 12 и в таблице 25 проиллюстрировано образование инделей в локусе альбумина, который был мишенью на стадии 2. На Фиг. 13А и в таблице 26 проиллюстрированы уровни белка hA1AT в сыворотке в различные моменты времени, измеренные методом ELISA (Abscam, кат. № ab108799). Как проиллюстрировано на Фиг. 13А, экспрессия hA1AT сохранялась в каждый оцениваемый момент времени для групп 1, 4, 5, 6 и 7 до 12 недель после введения дозы на стадии 2. На Фиг. 13В и в таблице 29 проиллюстрированы уровни белка hA1AT (дикого типа и мутантного) в сыворотке в различные моменты времени, измеренные методом ЖХ-МС/МС. Как проиллюстрировано на Фиг. 13В, уровни hA1AT снижались в каждой из групп, которым вводили дозы ЛНЧ, несущей мРНК Cas9 и орРНК G000409, нацеленную на трансген hSERPINA1 (например, группы 2, 3, 4 и 6), во время введения дозы на стадии 1. При этом, каждая из групп, которым вводили дозы ЛНЧ, несущей мРНК Cas9 и орРНК вместе с ssAAV, во время введения дозы на стадии 2, демонстрировали последующее повышение сывороточных уровней hA1AT.

Таблица 24: Условия редактирования для каждой исследуемой группы

Группа обработки	Фон	Стадия 1	Стадия 2
1	NGS-PiZ	Носитель (без КО)	Носитель (без вставки)
2	NGS-PiZ	G000409 (КО)	Носитель (без вставки)
3	NGS-PiZ	G000409 (КО)	P00450 (только AAV)
4	NGS-PiZ	G000409 (КО)	G000666+P00450 (вставка)
5	NGS-PiZ	Носитель (без КО)	G000666+P00450 (вставка)

6	NGS-PiZ	G000409 (KO)	G13019+P00450 (вставка)
---	---------	--------------	----------------------------

Таблица 25 - Образование инделей в mAlbumin

Группа обработки	mAlbumin		
	Среднее редактирование, %	CO	Образцы (n)
1	0,14	0,05	5
2	0,14	0,05	5
3	0,08	0,04	5
4	61,62	3,89	5
5	45,96	3,93	5
6	44,42	3,05	5

Таблица 26 - Уровни hA1AT в сыворотке, измеренные ELISA

Группа обработки	Тип данных	0 неделя	3 неделя	7 неделя	11 неделя	15 неделя
Группа 1	Среднее значение (мкг/мл)	1025,72	833,98	991,06	1216,32	1083,88
	CO	139,80	262,98	140,73	66,02	50,85
	Образцы (n)	5	5	5	5	5
Группа 2	Среднее значение (мкг/мл)	813,04	21,33	21,42	19,43	21,28
	CO	130,12	5,75	3,28	3,59	0
	Образцы (n)	5	5	5	5	5
Группа 3	Среднее	956,82	18,69	18,06	18,98	14,98

Группа 1	Среднее значение (мкг/мл)	2746, 67	1883, 33	2050 ,00	1752 ,50	1532, 00	1011,8 0	665, 00
	СО	1624, 85	310,0 5	704, 66	528, 04	390,2 2	207,33	85,2 0
	Образцы (n)	3	3	5	4	5	5	5
Группа 2	Среднее значение (мкг/мл)	2202, 00	40,50	32,2 8	36,7 0	34,25	39,90	33,2 5
	СО	438,9 4	N=1	8,60	10,6 1	9,11	20,25	14,0 4
	Образцы (n)	5	1	5	2	4	3	4
Группа 3	Среднее значение (мкг/мл)	2127, 50	НПО	НПО	НПО	25,00	27,60	2127 ,50
	СО	247,1 7				N=1	0,46	247, 17
	Образцы (n)	4				1	3	5
Группа 4	Среднее значение (мкг/мл)	2166, 67	33,80	404, 00	527, 00	594,6 0	583,20	494, 40
	СО	328,6 8	N=1	68,7 5	108, 28	87,63	105,43	59,4 5
	Образцы (n)	3	1	5	5	5	5	5
Группа 5	Среднее значение (мкг/мл)	1950, 00	1895, 00	3444 ,00	2655 ,00	3884, 00	1936,0 0	1587 ,50
	СО	223,3 8	169,0 2	1105 ,05	722, 84	1116, 03	551,39	521, 24
	Образцы (n)	3	4	5	4	5	5	4
Группа 6	Среднее значение	2242,	27,40	474,8	654,2	732,4	717,20	105,8

	(мкг/мл)	50		0	0	0		6
	СО	296,4 7	N=1	127,0 3	164,2 7	153,2 2	635,20	123,8 1
	Образцы (n)	4	1	5	5	5	5	5

НПО=Ниже предела обнаружения в 25 мкг/мл

Значение НПО не учитываются для расчетов среднего значения и стандартного отклонения

Пример 12 - Уровень экспрессии hA1AT in vivo с различными дозами ЛНЧ или AAV

В этом примере оценивали уровень экспрессии hA1AT у мышей, обработанных различными дозами ЛНЧ или AAV. ssAAV и ЛНЧ, тестируемые в этом примере, получали и доставляли мышам, как описано в примере 1. Через две недели после введения дозы животных умерщвляли и собирали ткань печени и сыворотку для анализа редактирования и сывороточной экспрессии hA1AT, соответственно.

Мышам вводили (1) различные дозы ЛНЧ (например, 1 мг/кг, 0,3 мг/кг или 0,1 мг/кг по отношению к общему содержанию РНК-карго), несущих мРНК Cas9 и оРНК G000666 (нацеленную на альбумин мыши), или (2) различные дозы ssAAV, полученного из P00450 (например, 3e12 вг/мышь, 1e12 вг/мышь, 3e11 вг/мышь или 1e11 вг/мышь).

Уровни A1AT человека в сыворотке определяли методом ELISA (Aviva Biosystems, кат. № ОК1А00048) через одну неделю после введения дозы. На Фиг. 14А, Фиг. 14В и в таблице 27 проиллюстрированы уровни белка hA1AT в сыворотке с различными концентрациями ЛНЧ и AAV, измеренные методом ELISA. Референсные уровни hA1AT в плазме человека составляют приблизительно 3450,9 мкг/мл. Результаты по редактированию в локусе альбумина мыши проиллюстрированы на Фиг. 14С, Фиг. 14D и в таблице 28. Как проиллюстрировано на Фиг. 14, Фиг. 14В, Фиг. 14С и Фиг. 14D, экспрессия hA1AT и образование инделей повышались дозозависимым образом при повышении дозы ЛНЧ или AAV, соответственно. Кроме того, вставка hSERPINA1 у крыс линии Вистар с использованием ssAAV и различных доз ЛНЧ (например, 3 мг/кг, 1 мг/кг или 0,3 мг/кг по отношению к общему содержанию РНК-карго), несущих мРНК Cas9 и оРНК G013019 (нацеленную на альбумин крысы), показала, что повышение доз ЛНЧ приводит к повышению экспрессии hA1AT в сыворотке в течение 2 недель (данные не приведены).

Таблица 27: Уровни hA1AT в сыворотке

Условие	Среднее значение (мкг/мл)	СО	Образцы (n)
1 мг/кг (ЛНЧ) и 1e12 (AAV)	1827,13	824,68	5
0,3 мг/кг (ЛНЧ) и 1e12 (AAV)	408,26	169,47	5

0,1 мг/кг (ЛНЧ) и 1e12 (AAV)	28,54	4,10	5
1 мг/кг (ЛНЧ) и 3e12 (AAV)	2714,41	1439,31	5
1 мг/кг (ЛНЧ) и 1e12 (AAV)	1827,13	824,68	5
1 мг/кг (ЛНЧ) и 3e11 (AAV)	399,09	160,19	5
1 мг/кг (ЛНЧ) и 1e11 (AAV)	188,63	86,21	5
Плазма человека			

Таблица 28: Редактирование в локусе альбумина мыши

Условие	Среднее % инделей	CO	Образцы
1 мг/кг (ЛНЧ) и 1e12 (AAV)	48,56	6,29	5
0,3 мг/кг (ЛНЧ) и 1e12 (AAV)	20,16	5,31	5
0,1 мг/кг (ЛНЧ) и 1e12 (AAV)	2,54	1,02	5
1 мг/кг (ЛНЧ) и 3e12 (AAV)	40,62	8,94	5
1 мг/кг (ЛНЧ) и 1e12 (AAV)	48,56	6,29	5
1 мг/кг (ЛНЧ) и 3e11 (AAV)	46,66	6,58	5
1 мг/кг (ЛНЧ) и 1e11 (AAV)	47,88	3,67	5

Пример 13 - Нецелевой анализ направляющих альбумина человека

Использовали биохимический метод (смотрите, например, Cameron et al., Nature Methods. 6, 600-606; 2017) для определения потенциальных нецелевых геномных сайтов, расщепляемых Cas9, нацеленной на альбумин. В этом эксперименте проводили скрининг 13 огРНК, нацеленных на человеческий альбумин, и две контрольные направляющие с известными нецелевыми профилями, используя выделенную геномную ДНК НЕК293. Число потенциальных нецелевых сайтов, обнаруженных с использованием концентрации направляющих 16 нМ в биохимическом анализе, приведено в таблице 30. Анализ позволил идентифицировать потенциальные нецелевые сайты для тестируемых огРНК.

Таблица 30 - Нецелевой анализ

ID гРНК	Мишень	Направляющая последовательность	Число нецелевых сайтов (улучшенный выход)
G012753	Альбумин	GACUGAAACUUCACAGAAUA	62
G012761	Альбумин	AGUGCAAUGGAUAGGUCUUU	75
G012752	Альбумин	UGACUGAAACUUCACAGAAU	223
G012764	Альбумин	CCUCACUCUUGUCUGGGCAA	3985
G012763	Альбумин	UGGGCAAGGGAAGAAAAAA	5443

G009857	Альбумин	AUUUAUGAGAUCAACAGCAC	131
G009859	Альбумин	UUAAAUAAGCAUAGUGCAA	91
G009860	Альбумин	UAAAGCAUAGUGCAAUGGAU	133
G012762	Альбумин	UGAUUCCUACAGAAAAACUC	68
G009844	Альбумин	GAGCAACCUCACUCUUGUCU	107
G012765	Альбумин	ACCUCACUCUUGUCUGGGCA	41
G012766	Альбумин	UGAGCAACCUCACUCUUGUC	78
G009874	Альбумин	UAAUAAAAUCAAACAUCU	53
G000644	EMX1	GAGUCCGAGCAGAAGAAGAA	304
G000645	VEGFA	GACCCCUCCACCCCGCCUC	1641

В известных анализах обнаружения нецелевых объектов, таких как биохимический метод, который использовали выше, большое количество потенциальных нецелевых сайтов обычно восстанавливают при конструировании, чтобы «создать широкую сеть» для потенциальных сайтов, которые можно проверить в другом контексте, например, в представляющей интерес первичной клетке. Например, в биохимическом методе, как правило, число потенциальных нецелевых сайтов представлено в избытке, поскольку в анализе используется очищенная высокомолекулярная геномная ДНК, не содержащая клеточное окружение, а анализ зависит от используемой дозы РНП Cas9. Соответственно, потенциальные нецелевые сайты, идентифицированные этими методами, можно подтверждать, используя нацеленное секвенирование идентифицированных потенциальных нецелевых сайтов.

Интрон 1 альбумина человека: (SEQ ID NO: 1)

GTAAGAAATCCATTTTTCTATTGTTCAACTTTTATTCTATTTTCCCAGTAAAAT
AAAGTTTTAGTAAACTCTGCATCTTTAAAGAATTATTTTGGCATTTATTTCTAAAATG
GCATAGTATTTTGTATTTGTGAAGTCTTACAAGGTTATCTTATTAATAAAAATTCAAAC
ATCCTAGGTAAAAAAGGTCAGAATTGTTTAGTGACTGTAATTTTCTTTTG
CGCACTAAGGAAAGTGCAAAGTAACTTAGAGTGACTGAAACTTCACAGAATAGGGT
TGAAGATTGAATTCATAACTATCCCAAAGACCTATCCATTGCACTATGCTTTATTTA
AAAACCACAAAACCTGTGCTGTTGATCTCATAAATAGAACTTGATTTATATTTATTT
TCATTTTAGTCTGTCTTCTTGGTTGCTGTTGATAGACACTAAAAGAGTATTAGATATT
ATCTAAGTTTGAATATAAGGCTATAAATATTTAATAATTTTAAAATAGTATTCTTGG
TAATTGAATTATTCTTCTGTTTAAAGGCAGAAGAAATAATTGAACATCATCCTGAGT
TTTTCTGTAGGAATCAGAGCCCAATATTTTGAAACAAATGCATAATCTAAGTCAAAT
GGAAAGAAATATAAAAAGTAAACATTACTTCTTGTTTTCTTCAGTATTTAACAAT
CSTTTTTTTTCTTCCCTTGCCCAG

Таблица 9: орРНК человека и профили модификации

ID направляю	Полная последовательность	SEQ ID	Модифицированная полная последовательность	SEQ ID
--------------	---------------------------	--------	--	--------

шей		NO:		NO:
G009844	GAGCAACCUCACUCU UGUCUGUUUU AGAGCUAGAAAUAG CAAGUUAAAAU AAGGCUAGUCCGUU AUCAACUUGAA AAAGUGGCACCGAG UCGGUGCUUUU	34	mG*mA*mG*CAACCUCACU CUUGUCUGU UUUAGAmGmCmUmAmGmA mAmAmUm AmGmCAAGUUAAAAUAAG GCUAGUCC GUUAUCAmAmCmUmUmGm AmAmAmAm AmGmUmGmGmCmAmCmCm GmAmGmUm CmGmGmUmGmCmU*mU*m U*mU	66
G009851	AUGCAUUUGUUUCA AAUAUGUUUU AGAGCUAGAAAUAG CAAGUUAAAAU AAGGCUAGUCCGUUA UCAACUUGAA AAAGUGGCACCGAGU CGGUGCUUUU	35	mA*mU*mG*CAUUUGUUUC AAAAUAUG UUUUAGAmGmCmUmAmGm AmAmAmUm AmGmCAAGUUAAAAUAAG GCUAGUCCG UUAUCAmAmCmUmUmGmA mAmAmAmAm GmUmGmGmCmAmCmCmGm AmGmUmCm GmGmUmGmCmU*mU*mU*m U	67
G009852	UGCAUUUGUUUCA AAUAUUGUUUU AGAGCUAGAAAUAG CAAGUUAAAAU AAGGCUAGUCCGUUA UCAACUUGAA AAAGUGGCACCGAGU CGGUGCUUUU	36	mU*mG*mC*AUUUGUUUCA AAUAUUGU UUUAGAmGmCmUmAmGmA mAmAmUmAm GmCAAGUUAAAAUAAGGC UAGUCCGUUA UCAmAmCmUmUmGmAmAm AmAmAmGmUmGmGmCmAm CmCmGmAmGmUmCmGmGm UmGmCmU*mU*mU*mU	68

G009857	AUUUAUGAGAUCAA CAGCACGUUUU AGAGCUAGAAUAG CAAGUAAAAU AAGGCUAGUCCGUUA UCAACUUGAA AAAGUGGCACCGAGU CGGUGCUUUU	37	mA*mU*mU*UAUGAGAUCA ACAGCACGU UUUAGAmGmCmUmAmGmA mAmAmUmAm GmCAAGUAAAAUAAGGC UAGUCCGUUA UCAmAmCmUmUmGmAmAm AmAmAmGm UmGmGmCmAmCmCmGmAm GmUmCmGmGmUmGmCmU* mU*mU*mU	69
G009858	GAUCAACAGCACAGG UUUUGGUUUU AGAGCUAGAAUAG CAAGUAAAAU AAGGCUAGUCCGUUA UCAACUUGAA AAAGUGGCACCGAGU CGGUGCUUUU	38	mG*mA*mU*CAACAGCACA GGUUUUGGU UUUAGAmGmCmUmAmGmA mAmAmUmAm GmCAAGUAAAAUAAGGC UAGUCCGUUA UCAmAmCmUmUmGmAmAm AmAmAmGm UmGmGmCmAmCmCmGmAm GmUmCmGm GmUmGmCmU*mU*mU*mU	70
G009859	UAAAAUAAAGCAUA GUGCAAGUUUU AGAGCUAGAAUAG CAAGUAAAAU AAGGCUAGUCCGUUA UCAACUUGAA AAAGUGGCACCGAGU CGGUGCUUUU	39	mU*mU*mA*AAUAAAGCAU AGUGCAAGUUUUAGAmGm CmUmAmGmAmAmUmAm GmCAAGUAAAAUAAGGC UAGUCCGUUAUCAmAmCm UmUmGmAmAmAmAmAmGm UmGmGmCmAmCmCmGmAm GmUmCmGmGmUmGmCmU* mU*mU*mU	71
G009860	UAAAGCAUAGUGCA AUGGAUGUUUU AGAGCUAGAAUAG CAAGUAAAAU	40	mU*mA*mA*AGCAUAGUGC AAUGGAUGUUUUAGAmGm CmUmAmGmAmAmUmAm GmCAAGUAAAAUAAGGC	72

	AAGGCUAGUCCGUUA UCAACUUGAA AAAGUGGCACCGAGU CGGUGCUUUU		UAGUCCGUUAUCAmAmCm UmUmGmAmAmAmAmAmGm UmGmGmCmAmCmCmGmAm GmUmCmGmGmUmGmCmU* mU*mU*mU	
G009861	UAGUGCAAUGGAUA GGUCUUGUUUU AGAGCUAGAAAUAG CAAGUUAAAAU AAGGCUAGUCCGUUA UCAACUUGAA AAAGUGGCACCGAGU CGGUGCUUUU	41	mU*mA*mG*UGCAAUGGAU AGGUCUUGUUUUAGAmGm CmUmAmGmAmAmAmUmAm GmCAAGUUAAAAUAAGGC UAGUCCGUUAUCAmAmCm UmUmGmAmAmAmAmAmGm UmGmGmCmAmCmCmGmAm GmUmCmGmGmUmGmCmU* mU*mU*mU	73
G009866	UACUAAAACUUUAU UUUACUGUUUU AGAGCUAGAAAUAG CAAGUUAAAAU AAGGCUAGUCCGUUA UCAACUUGAA AAAGUGGCACCGAGU CGGUGCUUUU	42	mU*mA*mC*UAAAACUUUA UUUUACUGUUUUAGAmGm CmUmAmGmAmAmAmUmAm GmCAAGUUAAAAUAAGGC UAGUCCGUUAUCAmAmCm UmUmGmAmAmAmAmAmGm UmGmGmCmAmCmCmGmAm GmUmCmGmGmUmGmCmU* mU*mU*mU	74
G009867	AAAGUUGAACAAUA GAAAAAGUUUU AGAGCUAGAAAUAG CAAGUUAAAAU AAGGCUAGUCCGUUA UCAACUUGAA AAAGUGGCACCGAGU CGGUGCUUUU	43	mA*mA*mA*GUUGAACAAU AGAAAAAGUUUUAGAmGm CmUmAmGmAmAmAmUmAm GmCAAGUUAAAAUAAGGC UAGUCCGUUAUCAmAmCm UmUmGmAmAmAmAmAmGm UmGmGmCmAmCmCmGmAm GmUmCmGmGmUmGmCmU* mU*mU*mU	75
G009868	AAUGCAUAAUCUAA GUCAAAGUUUU AGAGCUAGAAAUAG	44	mA*mA*mU*GCAUAAUCUA AGUCAAGUUUUAGAmGm CmUmAmGmAmAmAmUmAm	76

	CAAGUUAAAAU AAGGCUAGUCCGUUA UCAACUUGAA AAAGUGGCACCGAGU CGGUGCUUUU		GmCAAGUUAAAAUAAGGC UAGUCCGUUAUCAmAmCm UmUmGmAmAmAmAmAmGm UmGmGmCmAmCmCmGmAm GmUmCmGmGmUmGmCmU* mU*mU*mU	
G009874	UAAUAAAAUUCAAA CAUCCUGUUUU AGAGCUAGAAAUAG CAAGUUAAAAU AAGGCUAGUCCGUUA UCAACUUGAA AAAGUGGCACCGAGU CGGUGCUUUU	45	mU*mA*mA*UAAAAUUCAA ACAUCCUGUUUUAGAmGmC mUmAmGmAmAmAmUmAmG mCAAGUUAAAAUAAGGCU AGUCCGUUAUCAmAmCmU mUmGmAmAmAmAmAmGmU mGmGmCmAmCmCmGmAmG mUmCmGmGmUmGmCmU*m U*mU*mU	77
G012747	GCAUCUUUAAAGAA UUAUUUGUUUU AGAGCUAGAAAUAG CAAGUUAAAAU AAGGCUAGUCCGUUA UCAACUUGAA AAAGUGGCACCGAGU CGGUGCUUUU	46	mG*mC*mA*UCUUUAAAGA AUUAUUUGUUUUAGAmGm CmUmAmGmAmAmAmUmAm GmCAAGUUAAAAUAAGGC UAGUCCGUUAUCAmAmCm UmUmGmAmAmAmAmAmGm UmGmGmCmAmCmCmGmAm GmUmCmGmGmUmGmCmU* mU*mU*mU	78
G012748	UUUGGCAUUUAUUU CUAAAAGUUUU AGAGCUAGAAAUAG CAAGUUAAAAU AAGGCUAGUCCGUUA UCAACUUGAA AAAGUGGCACCGAGU CGGUGCUUUU	47	mU*mU*mU*GGCAUUUAUU UCUAAAAGUUUUAGAmGm CmUmAmGmAmAmAmUmAm GmCAAGUUAAAAUAAGGC UAGUCCGUUAUCAmAmCm UmUmGmAmAmAmAmAmGm UmGmGmCmAmCmCmGmAm GmUmCmGmGmUmGmCmU* mU*mU*mU	79
G012749	UGUAUUUGUGAAGU CUUACAGUUUU	48	mU*mG*mU*AUUUGUGAAG UCUACAGUUUUAGAmGm	80

	AGAGCUAGAAUAG CAAGUAAAAU AAGGCUAGUCCGUUA UCAACUUGAA AAAGUGGCACCGAGU CGGUGCUUUU		CmUmAmGmAmAmAmUmAm GmCAAGUAAAAUAGGC UAGUCCGUUAUCAmAmCm UmUmGmAmAmAmAmAmGm UmGmGmCmAmCmCmGmAm GmUmCmGmGmUmGmCmU* mU*mU*mU	
G012750	UCCUAGGUAAAAA AAAAAAGUUUU AGAGCUAGAAUAG CAAGUAAAAU AAGGCUAGUCCGUUA UCAACUUGAA AAAGUGGCACCGAGU CGGUGCUUUU	49	mU*mC*mC*UAGGUAAAA AAAAAAGUUUUAGAmGm CmUmAmGmAmAmAmUmAm GmCAAGUAAAAUAGGC UAGUCCGUUAUCAmAmCm UmUmGmAmAmAmAmAmGm UmGmGmCmAmCmCmGmAm GmUmCmGmGmUmGmCmU* mU*mU*mU	81
G012751	UAAUUUUCUUUUGC GCACUAGUUUU AGAGCUAGAAUAG CAAGUAAAAU AAGGCUAGUCCGUUA UCAACUUGAA AAAGUGGCACCGAGU CGGUGCUUUU	50	mU*mA*mA*UUUUCUUUUG CGCACUAGUUUUAGAmGmC mUmAmGmAmAmAmUmAmG mCAAGUAAAAUAGGCU AGUCCGUUAUCAmAmCmU mUmGmAmAmAmAmAmGmU mGmGmCmAmCmCmGmAmG mUmCmGmGmUmGmCmU*m U*mU*mU	82
G012752	UGACUGAAACUUCAC AGAAUGUUUU AGAGCUAGAAUAG CAAGUAAAAU AAGGCUAGUCCGUUA UCAACUUGAA AAAGUGGCACCGAGU CGGUGCUUUU	51	mU*mG*mA*CUGAAACUUC ACAGAAUGUUUUAGAmGm CmUmAmGmAmAmAmUmAm GmCAAGUAAAAUAGGC UAGUCCGUUAUCAmAmCm UmUmGmAmAmAmAmAmGm UmGmGmCmAmCmCmGmAm GmUmCmGmGmUmGmCmU* mU*mU*mU	83
G012753	GACUGAAACUUCACA	52	mG*mA*mC*UGAAACUUCA	84

	<p>GAAUAGUUUU AGAGCUAGAAAUAG CAAGUUAAAAU AAGGCUAGUCCGUUA UCAACUUGAA AAAGUGGCACCGAGU CGGUGCUUUU</p>		<p>CAGAAUAGUUUUAGAmGm CmUmAmGmAmAmAmUmAm GmCAAGUUAAAAUAAGGC UAGUCCGUUAUCAmAmCm UmUmGmAmAmAmAmAmGm UmGmGmCmAmCmCmGmAm GmUmCmGmGmUmGmCmU* mU*mU*mU</p>	
G012754	<p>UUCAUUUUAGUCUG UCUUCUGUUUU AGAGCUAGAAAUAG CAAGUUAAAAU AAGGCUAGUCCGUUA UCAACUUGAA AAAGUGGCACCGAGU CGGUGCUUUU</p>	53	<p>mU*mU*mC*AUUUUAGUCU GUCUUCUGUUUUAGAmGm CmUmAmGmAmAmAmUmAm GmCAAGUUAAAAUAAGGC UAGUCCGUUAUCAmAmCm UmUmGmAmAmAmAmAmGm UmGmGmCmAmCmCmGmAm GmUmCmGmGmUmGmCmU* mU*mU*mU</p>	85
G012755	<p>AUUAUCUAAGUUUG AAUAUAGUUUU AGAGCUAGAAAUAG CAAGUUAAAAU AAGGCUAGUCCGUUA UCAACUUGAA AAAGUGGCACCGAGU CGGUGCUUUU</p>	54	<p>mA*mU*mU*AUCUAAGUUU GAAUAUAGUUUUAGAmGm CmUmAmGmAmAmAmUmAm GmCAAGUUAAAAUAAGGC UAGUCCGUUAUCAmAmCm UmUmGmAmAmAmAmAmGm UmGmGmCmAmCmCmGmAm GmUmCmGmGmUmGmCmU* mU*mU*mU</p>	86
G012756	<p>AAUUUUUAAAAUAG UAUUCUGUUUU AGAGCUAGAAAUAG CAAGUUAAAAU AAGGCUAGUCCGUUA UCAACUUGAA AAAGUGGCACCGAGU CGGUGCUUUU</p>	55	<p>mA*mA*mU*UUUUAAAAUA GUAUUCUGUUUUAGAmGm CmUmAmGmAmAmAmUmAm GmCAAGUUAAAAUAAGGC UAGUCCGUUAUCAmAmCm UmUmGmAmAmAmAmAmGm UmGmGmCmAmCmCmGmAm GmUmCmGmGmUmGmCmU* mU*mU*mU</p>	87

G012757	UGAAUUAUUCUUCU GUUUAAGUUUU AGAGCUAGAAAUAG CAAGUUA AAAU AAGGCUAGUCCGUUA UCAACUUGAA AAAGUGGCACCGAGU CGGUGCUUUU	56	mU*mG*mA*AUUAUUCUUC UGUUUAAGUUUUAGAmGm CmUmAmGmAmAmUmAm GmCAAGUUA AAAUAGGC UAGUCCGUUAUCAmAmCm UmUmGmAmAmAmAmGm UmGmGmCmAmCmCmGmAm GmUmCmGmGmUmGmCmU* mU*mU*mU	88
G012758	AUCAUCCUGAGUUUU UCUGUGUUUU AGAGCUAGAAAUAG CAAGUUA AAAU AAGGCUAGUCCGUUA UCAACUUGAA AAAGUGGCACCGAGU CGGUGCUUUU	57	mA*mU*mC*AUCCUGAGUU UUUCUGUGUUUUAGAmGm CmUmAmGmAmAmUmAm GmCAAGUUA AAAUAGGC UAGUCCGUUAUCAmAmCm UmUmGmAmAmAmAmGm UmGmGmCmAmCmCmGmAm GmUmCmGmGmUmGmCmU* mU*mU*mU	89
G012759	UUACUAAAACUUUA UUUUACGUUUU AGAGCUAGAAAUAG CAAGUUA AAAU AAGGCUAGUCCGUUA UCAACUUGAA AAAGUGGCACCGAGU CGGUGCUUUU	58	mU*mU*mA*CUAAAACUUU AUUUUACGUUUUAGAmGm CmUmAmGmAmAmUmAm GmCAAGUUA AAAUAGGC UAGUCCGUUAUCAmAmCm UmUmGmAmAmAmAmGm UmGmGmCmAmCmCmGmAm GmUmCmGmGmUmGmCmU* mU*mU*mU	90
G012760	ACCUUUUUUUUUU UUACCUGUUUU AGAGCUAGAAAUAG CAAGUUA AAAU AAGGCUAGUCCGUUA UCAACUUGAA AAAGUGGCACCGAGU CGGUGCUUUU	59	mA*mC*mC*UUUUUUUUU UUUACCUGUUUUAGAmGm CmUmAmGmAmAmUmAm GmCAAGUUA AAAUAGGC UAGUCCGUUAUCAmAmCm UmUmGmAmAmAmAmGm UmGmGmCmAmCmCmGmAm GmUmCmGmGmUmGmCmU*	91

			mU*mU*mU	
G012761	AGUGCAAUGGAUAG GUCUUUGUUUU AGAGCUAGAAUAG CAAGUUAAAAU AAGGCUAGUCCGUUA UCAACUUGAA AAAGUGGCACCGAGU CGGUGCUUUU	60	mA*mG*mU*GCAAUGGAUA GGUCUUUGUUUUAGAmGm CmUmAmGmAmAmAmUmAm GmCAAGUUAAAAUAAGGC UAGUCCGUUAUCAmAmCm UmUmGmAmAmAmAmAmGm UmGmGmCmAmCmCmGmAm GmUmCmGmGmUmGmCmU* mU*mU*mU	92
G012762	UGAUUCCUACAGAAA AACUCGUUUU AGAGCUAGAAUAG CAAGUUAAAAU AAGGCUAGUCCGUUA UCAACUUGAA AAAGUGGCACCGAGU CGGUGCUUUU	61	mU*mG*mA*UCCUACAGA AAAACUCGUUUUAGAmGm CmUmAmGmAmAmAmUmAm GmCAAGUUAAAAUAAGGC UAGUCCGUUAUCAmAmCm UmUmGmAmAmAmAmAmGm UmGmGmCmAmCmCmGmAm GmUmCmGmGmUmGmCmU* mU*mU*mU	93
G012763	UGGGCAAGGGAAGA AAAAAAGUUUU AGAGCUAGAAUAG CAAGUUAAAAU AAGGCUAGUCCGUUA UCAACUUGAA AAAGUGGCACCGAGU CGGUGCUUUU	62	mU*mG*mG*GCAAGGGAAG AAAAAAGUUUUAGAmGm CmUmAmGmAmAmAmUmAm GmCAAGUUAAAAUAAGGC UAGUCCGUUAUCAmAmCm UmUmGmAmAmAmAmAmGm UmGmGmCmAmCmCmGmAm GmUmCmGmGmUmGmCmU* mU*mU*mU	94
G012764	CCUCACUCUUGUCUG GGCAAGUUUU AGAGCUAGAAUAG CAAGUUAAAAU AAGGCUAGUCCGUUA UCAACUUGAA AAAGUGGCACCGAGU	63	mC*mC*mU*CACUCUUGUCU GGGCAAGUUUUAGAmGmC mUmAmGmAmAmAmUmAmG mCAAGUUAAAAUAAGGCU AGUCCGUUAUCAmAmCmU mUmGmAmAmAmAmAmGmU mGmGmCmAmCmCmGmAmG	95

	CGGUGCUUUU		mUmCmGmGmUmGmCmU*m U*mU*mU	
G012765	ACCUCACUCUUGUCU GGGCAGUUUU AGAGCUAGAAAUAG CAAGUUAAAAU AAGGCUAGUCCGUUA UCAACUUGAA AAAGUGGCACCGAGU CGGUGCUUUU	64	mA*mC*mC*UCACUCUUGUC UGGGCAGUUUUAGAmGmC mUmAmGmAmAmUmAmG mCAAGUUAAAAUAAGGCU AGUCCGUUAUCAmAmCmU mUmGmAmAmAmAmGmU mGmGmCmAmCmGmAmG mUmCmGmGmUmGmCmU*m U*mU*mU	96
G012766	UGAGCAACCUCACUC UUGUCGUUUU AGAGCUAGAAAUAG CAAGUUAAAAU AAGGCUAGUCCGUUA UCAACUUGAA AAAGUGGCACCGAGU CGGUGCUUUU	65	mU*mG*mA*GCAACCUCAC UCUUGUCGUUUUAGAmGm CmUmAmGmAmAmUmAm GmCAAGUUAAAAUAAGGC UAGUCCGUUAUCAmAmCm UmUmGmAmAmAmAmGm UmGmGmCmAmCmGmAm GmUmCmGmGmUmGmCmU* mU*mU*mU	97

Таблица 10. Гидовая РНК мышиноного альбумина

ID направляющей	Направляющая последовательность	Геномные координаты мыши (mm10)	SEQ ID NO:
G000551	AUUUGCAUCUGAGAACCCUU	xp5:90461148-90461168	98
G000552	AUCGGGAACUGGCAUCUUCA	xp5:90461590-90461610	99
G000553	GUUACAGGAAAUCUGAAGG	xp5:90461569-90461589	100
G000554	GAUCGGGAACUGGCAUCUUC	xp5:90461589-90461609	101
G000555	UGCAUCUGAGAACCCUUAGG	xp5:90461151-90461171	102
G000666	CACUCUUGUCUGUGGAAACA	xp5:90461709-90461729	103
G000667	AUCGUUACAGGAAAUCUGA	xp5:90461572-90461592	104
G000668	GCAUCUUCAGGGAGUAGCUU	xp5:90461601-90461621	105
G000669	CAAUCUUUAAAUAUGUUGUG	xp5:90461674-90461694	106
G000670	UCACUCUUGUCUGUGGAAAC	xp5:90461710-90461730	107

ID направляющей	Направляющая последовательность	Геномные координаты мыши (mm10)	SEQ ID NO:
G011722	UGCUUGUAUUUUUCUAGUAA	xp5:90461039-90461059	108
G011723	GUAAAUAUCUACUAAGACAA	xp5:90461425-90461445	109
G011724	UUUUUCUAGUAAUGGAAGCC	xp5:90461047-90461067	110
G011725	UUAUAUUAUUGAUUAUUUU	xp5:90461174-90461194	111
G011726	GCACAGAUUAAAACACUAAA	xp5:90461480-90461500	112
G011727	CACAGAUUAAAACACUUAAC	xp5:90461481-90461501	113
G011728	GGUUUUAAAAAUAAUAAUGU	xp5:90461502-90461522	114
G011729	UCAGAUUUUCCUGUAACGAU	xp5:90461572-90461592	115
G011730	CAGAUUUUCCUGUAACGAUC	xp5:90461573-90461593	116
G011731	CAAUGGUAUUAAAGAAAUA	xp5:90461408-90461428	117
G013018	GGAAAUCUGAAGGUGGCAA	xp5:90461563-90461583	118
G013019	GGCGAUCUCACUCUUGUCUG	xp5:90461717-90461737	119

Таблица 11. Гидовая оРНК альбумина мыши и профиль модификации

ID направляющей	Полная последовательность	SEQ ID NO:	Модифицированная полная последовательность	SEQ ID NO:
G000551	AUUUGCAUCUGAG AACCCUUGUUUUA GAGCUAGAAUAG CAAGUUAUUAA GGCUAGUCCGUUA UCAACUUGAAAA GUGGCACCGAGUC GGUGCUUUU	120	mA*mU*mU*UGCAUCUGAGAAC CCUUGUUUUAGAmGmCmUmAm GmAmAmUmAmGmCAAGUU AAAAUAAGGCUAGUCCGUUAU CAmAmCmUmUmGmAmAmAmA mAmGmUmGmGmCmAmCmCmG mAmGmUmCmGmGmUmGmCmU* mU*mU*mU	142
G000552	AUCGGGAACUGGC AUCUUCA GUUUUAGAGCUAG AAUAGC AAGUUAUUAAAG GCUAGUC CGUUAUCAACUUG	121	mA*mU*mC*GGGAACUGGCAUC UUCAGUUUUAGAmGmCmUmAm GmAmAmUmAmGmCAAGUU AAAAUAAGGCUAGUCCGUUAU CAmAmCmUmUmGmAmAmAmA mAmGmUmGmGmCmAmCmCmG mAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*	143

	AAAAAGU GGCACCGAGUCGG UGCUIUUU		mU*mU*mU	
G000553	GUUACAGGAAAAU CUGAAGG GUUUUAGAGCUAG AAAUAGC AAGUUA AAAUAAG GCUAGUC CGUUAUCAACUUG AAAAAGU GGCACCGAGUCGG UGCUIUUU	122	mG*mU*mU*ACAGGAAAAUCUG AAGGGUUUUAGAmGmCmUmAm GmAmAmAmUmAmGmCAAGUU AAAAUAAGGCUAGUCCGUUAU CAmAmCmUmUmGmAmAmAmA mAmGmUmGmGmCmAmCmCmG mAmGmUmCmGmGmUmGmCmU* mU*mU*mU	144
G000554	GAUCGGGAACUGG CAUCUUC GUUUUAGAGCUAG AAAUAGC AAGUUA AAAUAAG GCUAGUC CGUUAUCAACUUG AAAAAGU GGCACCGAGUCGG UGCUIUUU	123	mG*mA*mU*CGGGAACUGGCAU CUUCGUUUUAGAmGmCmUmAm GmAmAmAmUmAmGmCAAGUU AAAAUAAGGCUAGUCCGUUAU CAmAmCmUmUmGmAmAmAmA mAmGmUmGmGmCmAmCmCmG mAmGmUmCmGmGmUmGmCmU* mU*mU*mU	145
G000555	UGCAUCUGAGAAC CCUUAGG GUUUUAGAGCUAG AAAUAGC AAGUUA AAAUAAG GCUAGUC CGUUAUCAACUUG AAAAAGU GGCACCGAGUCGG UGCUIUUU	124	mU*mG*mC*AUCUGAGAACCCU UAGGGUUUUAGAmGmCmUmAm GmAmAmAmUmAmGmCAAGUU AAAAUAAGGCUAGUCCGUUAU CAmAmCmUmUmGmAmAmAmA mAmGmUmGmGmCmAmCmCmG mAmGmUmCmGmGmUmGmCmU* mU*mU*mU	146
G000666	CACUCUUGUCUGU GGAAACA	125	mC*mA*mC*UCUUGUCUGUGGA AACAGUUUUAGAmGmCmUmAm	147

	<p>GUUUUAGAGCUAG AAAUAGC AAGUUA AAAUAAG GCUAGUC CGUUAUCAACUUG AAAAAGU GGCACCGAGUCGG UGC UUUU</p>		<p>GmAmAmAmUmAmGmCAAGUU AAAAUAAGGCUAGUCCGUUAU CAmAmCmUmUmGmAmAmAmA mAmGmUmGmGmCmAmCmCmG mAmGmUmCmGmGmUmGmCmU* mU*mU*mU</p>	
G000667	<p>AUCGUUACAGGAA AAUCUGA GUUUUAGAGCUAG AAAUAGC AAGUUA AAAUAAG GCUAGUC CGUUAUCAACUUG AAAAAGU GGCACCGAGUCGG UGC UUUU</p>	126	<p>mA*mU*mC*GUUACAGGAAAAU CUGAGUUUUAGAmGmCmUmAm GmAmAmAmUmAmGmCAAGUU AAAAUAAGGCUAGUCCGUUAU CAmAmCmUmUmGmAmAmAmA mAmGmUmGmGmCmAmCmCmG mAmGmUmCmGmGmUmGmCmU* mU*mU*mU</p>	148
G000668	<p>GCAUCUUCAGGGA GUAGCUU GUUUUAGAGCUAG AAAUAGC AAGUUA AAAUAAG GCUAGUC CGUUAUCAACUUG AAAAAGU GGCACCGAGUCGG UGC UUUU</p>	127	<p>mG*mC*mA*UCUUCAGGGAGUA GCUUGUUUUAGAmGmCmUmAm GmAmAmAmUmAmGmCAAGUU AAAAUAAGGCUAGUCCGUUAU CAmAmCmUmUmGmAmAmAmA mAmGmUmGmGmCmAmCmCmG mAmGmUmCmGmGmUmGmCmU* mU*mU*mU</p>	149
G000669	<p>CAAUCUUUAAAUA UGUUGUG GUUUUAGAGCUAG AAAUAGC AAGUUA AAAUAAG GCUAGUC CGUUAUCAACUUG</p>	128	<p>mC*mA*mA*UCUUUAAAUAUGU UGUGGUUUUAGAmGmCmUmAm GmAmAmAmUmAmGmCAAGUU AAAAUAAGGCUAGUCCGUUAU CAmAmCmUmUmGmAmAmAmA mAmGmUmGmGmCmAmCmCmG mAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*</p>	150

	AAAAAGU GGCACCGAGUCGG UGCUIUUU		mU*mU*mU	
G000670	UCACUCUUGUCUG UGGAAAC GUUUUAGAGCUAG AAAUAGC AAGUUA AAAUAAG GCUAGUC CGUUAUCAACUUG AAAAAGU GGCACCGAGUCGG UGCUIUUU	129	mU*mC*mA*CUCUUGUCUGUGG AAACGUUUUAGAmGmCmUmAm GmAmAmAmUmAmGmCAAGUU AAAAUAAGGCUAGUCCGUUAU CAmAmCmUmUmGmAmAmAmA mAmGmUmGmGmCmAmCmCmG mAmGmUmCmGmGmUmGmCmU* mU*mU*mU	151
G011722	UGCUIUGUAUUUUU CUAGUAA GUUUUAGAGCUAG AAAUAGC AAGUUA AAAUAAG GCUAGUC CGUUAUCAACUUG AAAAAGU GGCACCGAGUCGG UGCUIUUU	130	mU*mG*mC*UUGUAUUUUUCUA GUAAGUUUUAGAmGmCmUmAm GmAmAmAmUmAmGmCAAGUU AAAAUAAGGCUAGUCCGUUAU CAmAmCmUmUmGmAmAmAmA mAmGmUmGmGmCmAmCmCmG mAmGmUmCmGmGmUmGmCmU* mU*mU*mU	152
G011723	GUAAAUAUCUACU AAGACAA GUUUUAGAGCUAG AAAUAGC AAGUUA AAAUAAG GCUAGUC CGUUAUCAACUUG AAAAAGU GGCACCGAGUCGG UGCUIUUU	131	mG*mU*mA*AAUAUCUACUAAG ACAAGUUUUAGAmGmCmUmAm GmAmAmAmUmAmGmCAAGUU AAAAUAAGGCUAGUCCGUUAU CAmAmCmUmUmGmAmAmAmA mAmGmUmGmGmCmAmCmCmG mAmGmUmCmGmGmUmGmCmU* mU*mU*mU	153
G011724	UUUUUCUAGUAAU GGAAGCC	132	mU*mU*mU*UUCUAGUAAUGGA AGCCGUUUUAGAmGmCmUmAm	154

	<p>GUUUUAGAGCUAG AAAUAGC AAGUUA AAAUAAG GCUAGUC CGUUAUCAACUUG AAAAAGU GGCACCGAGUCGG UGC UUUU</p>		<p>GmAmAmAmUmAmGmCAAGUU AAAAUAAGGCUAGUCCGUUAU CAmAmCmUmUmGmAmAmAmA mAmGmUmGmGmCmAmCmCmG mAmGmUmCmGmGmUmGmCmU* mU*mU*mU</p>	
G011725	<p>UUAUAUUAUUGAU AUUUUU GUUUUAGAGCUAG AAAUAGC AAGUUA AAAUAAG GCUAGUC CGUUAUCAACUUG AAAAAGU GGCACCGAGUCGG UGC UUUU</p>	133	<p>mU*mU*mA*UAUUAUUGAUUA UUUUGUUUAGAmGmCmUmAm GmAmAmAmUmAmGmCAAGUU AAAAUAAGGCUAGUCCGUUAU CAmAmCmUmUmGmAmAmAmA mAmGmUmGmGmCmAmCmCmG mAmGmUmCmGmGmUmGmCmU* mU*mU*mU</p>	155
G011726	<p>GCACAGAUUAAA CACUUA GUUUUAGAGCUAG AAAUAGC AAGUUA AAAUAAG GCUAGUC CGUUAUCAACUUG AAAAAGU GGCACCGAGUCGG UGC UUUU</p>	134	<p>mG*mC*mA*CAGAUUAAACAC UUAAGUUUAGAmGmCmUmAm GmAmAmAmUmAmGmCAAGUU AAAAUAAGGCUAGUCCGUUAU CAmAmCmUmUmGmAmAmAmA mAmGmUmGmGmCmAmCmCmG mAmGmUmCmGmGmUmGmCmU* mU*mU*mU</p>	156
G011727	<p>CACAGAUUAAAC ACUUAAC GUUUUAGAGCUAG AAAUAGC AAGUUA AAAUAAG GCUAGUC CGUUAUCAACUUG</p>	135	<p>mC*mA*mC*AGAUUAAACACU UAACGUUUUAGAmGmCmUmAm GmAmAmAmUmAmGmCAAGUU AAAAUAAGGCUAGUCCGUUAU CAmAmCmUmUmGmAmAmAmA mAmGmUmGmGmCmAmCmCmG mAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*</p>	157

	AAAAAGU GGCACCGAGUCGG UGCUUUU		mU*mU*mU	
G011728	GGUUUUAAAAAUA AUA AUGU GUUUUAGAGCUAG AAAUAGC AAGUUAAAAUAAG GCUAGUC CGUUAUCAACUUG AAAAAGU GGCACCGAGUCGG UGCUUUU	136	mG*mG*mU*UUUAAAAUAAUA AUGUGUUUUAGAmGmCmUmAm GmAmAmAmUmAmGmCAAGUU AAAAUAAGGCUAGUCCGUUAU CAmAmCmUmUmGmAmAmAmA mAmGmUmGmGmCmAmCmCmG mAmGmUmCmGmGmUmGmCmU* mU*mU*mU	158
G011729	UCAGAUUUUCCUG UAACGAU GUUUUAGAGCUAG AAAUAGC AAGUUAAAAUAAG GCUAGUC CGUUAUCAACUUG AAAAAGU GGCACCGAGUCGG UGCUUUU	137	mU*mC*mA*GAUUUCCUGUAA CGAUGUUUUAGAmGmCmUmAm GmAmAmAmUmAmGmCAAGUU AAAAUAAGGCUAGUCCGUUAU CAmAmCmUmUmGmAmAmAmA mAmGmUmGmGmCmAmCmCmG mAmGmUmCmGmGmUmGmCmU* mU*mU*mU	159
G011730	CAGAUUUUCCUGU AACGAUC GUUUUAGAGCUAG AAAUAGC AAGUUAAAAUAAG GCUAGUC CGUUAUCAACUUG AAAAAGU GGCACCGAGUCGG UGCUUUU	138	mC*mA*mG*AUUUCCUGUAAC GAUCGUUUUAGAmGmCmUmAm GmAmAmAmUmAmGmCAAGUU AAAAUAAGGCUAGUCCGUUAU CAmAmCmUmUmGmAmAmAmA mAmGmUmGmGmCmAmCmCmG mAmGmUmCmGmGmUmGmCmU* mU*mU*mU	160
G011731	CAAUGGUAAAUA GAAAUA	139	mC*mA*mA*UGGUAAAUAAGAA AUAAGUUUUAGAmGmCmUmAm	161

	GUUUUAGAGCUAG AAAUAGC AAGUUA AAAUAAG GCUAGUC CGUUAUCAACUUG AAAAAGU GGCACCGAGUCGG UGC UUUU		GmAmAmAmUmAmGmCAAGUU AAAAUAAGGCUAGUCCGUUAU CAmAmCmUmUmGmAmAmAmA mAmGmUmGmGmCmAmCmCmG mAmGmUmCmGmGmUmGmCmU* mU*mU*mU	
G013018	GGAAAAUCUGAAG GUGGCAA GUUUUAGAGCUAG AAAUAGC AAGUUA AAAUAAG GCUAGUC CGUUAUCAACUUG AAAAAGU GGCACCGAGUCGG UGC UUUU	140	mG*mG*mA*AAAUCUGAAGGUG GCAAGUUUUAGAmGmCmUmAm GmAmAmAmUmAmGmCAAGUU AAAAUAAGGCUAGUCCGUUAU CAmAmCmUmUmGmAmAmAmA mAmGmUmGmGmCmAmCmCmG mAmGmUmCmGmGmUmGmCmU* mU*mU*mU	162
G013019	GGCGAUCUCACUC UUGUCUG GUUUUAGAGCUAG AAAUAGC AAGUUA AAAUAAG GCUAGUC CGUUAUCAACUUG AAAAAGU GGCACCGAGUCGG UGC UUUU	141	mG*mG*mC*GAUCUCACUCUUG UCUGGUUUUAGAmGmCmUmAm GmAmAmAmUmAmGmCAAGUU AAAAUAAGGCUAGUCCGUUAU CAmAmCmUmUmGmAmAmAmA mAmGmUmGmGmCmAmCmCmG mAmGmUmCmGmGmUmGmCmU* mU*mU*mU	163

Таблица 12. Гидовая РНК альбумина яванского макака

ID направляющей	Направляющая последовательность	Геномные координаты яванского макака (mf5)	SEQ ID NO:
G009844	GAGCAACCUCACUCUUGUCU	xp5:61198711-61198731	2*
G009845	AGCAACCUCACUCUUGUCUG	xp5:61198712-61198732	165
G009846	ACCUCACUCUUGUCUGGGGA	xp5:61198716-61198736	166

G009847	CCUCACUCUUGUCUGGGGAA	xp5:61198717-61198737	167
G009848	CUCACUCUUGUCUGGGGAAG	xp5:61198718-61198738	168
G009849	GGGGAAGGGGAGAAAAAAA	xp5:61198731-61198751	169
G009850	GGGAAGGGGAGAAAAAAA	xp5:61198732-61198752	170
G009851	AUGCAUUUGUUUCAAUAU	xp5:61198825-61198845	3*
G009852	UGCAUUUGUUUCAAUAUU	xp5:61198826-61198846	4*
G009853	UGAUUCCUACAGAAAAGUC	xp5:61198852-61198872	173
G009854	UACAGAAAAGUCAGGAUAA	xp5:61198859-61198879	174
G009855	UUUCUUCUGCCUUAAACAG	xp5:61198889-61198909	175
G009856	UUAUAGUUUUAUAUCAAAC	xp5:61198957-61198977	176
G009857	AUUUAUGAGAUAACAGCAC	xp5:61199062-61199082	5*
G009858	GAUCAACAGCACAGGUUUUG	xp5:61199070-61199090	6*
G009859	UAAAUAAGCAUAGUGCAA	xp5:61199096-61199116	7*
G009860	UAAAGCAUAGUGCAAUGGAU	xp5:61199101-61199121	8*
G009861	UAGUGCAAUGGAUAGGUCUU	xp5:61199108-61199128	9*
G009862	AGUGCAAUGGAUAGGUCUUA	xp5:61199109-61199129	182
G009863	UUACUUUGCACUUCCUUAG	xp5:61199186-61199206	183
G009864	UACUUUGCACUUCCUUAGU	xp5:61199187-61199207	184
G009865	UCUGACCUUUUAUUUUACCU	xp5:61199238-61199258	185
G009866	UACUAAAACUUUAUUUUACU	xp5:61199367-61199387	10*
G009867	AAAGUUGAACAAUAGAAAAA	xp5:61199401-61199421	11*
G009868	AAUGCAUAAUCUAAGUCAAA	xp5:61198812-61198832	12*
G009869	AUUAUCCUGACUUUUUCUGU	xp5:61198860-61198880	189
G009870	UGAAUUAUCCUCUGUUUAA	xp5:61198901-61198921	190
G009871	UAAUUUUCUUUUGCCCACUA	xp5:61199203-61199223	191
G009872	AAAAGGUCAGAAUUGUUUAG	xp5:61199229-61199249	192
G009873	AACAUCCUAGGUAAAUAUAA	xp5:61199246-61199266	193
G009874	UAAUAAAUAUCAACAUCU	xp5:61199258-61199278	13
G009875	UUGUCAUGUAUUUCUAAAAU	xp5:61199322-61199342	195
G009876	UUUGUCAUGUAUUUCUAAAA	xp5:61199323-61199343	196

SEQ ID NO, обозначенные выше «*», означают, что указанная гРНК применима как к яванскому макаку, так и к человеку.

Таблица 13: огРНК альбумина яванского макака и профили модификации

ID	Полная	SEQ	Модифицированная	полная	SEQ
----	--------	-----	------------------	--------	-----

направляющей	последовательность	ID NO:	последовательность	ID NO:
G009844	GAGCAACCUCACUC UUGUCU GUUUUAGAGCUAG AAAUAGC AAGUUAAAUAAG GCUAGUC CGUUAUCAACUUG AAAAAGU GGCACCGAGUCGGU GCUUUU	34*	mG*mA*mG*CAACCUCACUCU UGUCUGUUUUAG AmGmCmUmAmGmAmAmAmU mAmGmCAAGUUA AAAUAAGGCUAGUCCGUUAU CAmAmCmUmUm GmAmAmAmAmAmGmUmGmG mCmAmCmCmGm AmGmUmCmGmGmUmGmCmU* mU*mU*mU	66*
G009845	AGCAACCUCACUCU UGUCUG GUUUUAGAGCUAG AAAUAGC AAGUUAAAUAAG GCUAGUC CGUUAUCAACUUG AAAAAGU GGCACCGAGUCGGU GCUUUU	198	mA*mG*mC*AACCUCACUCUU GUCUGGUUUUAG AmGmCmUmAmGmAmAmAmU mAmGmCAAGUUA AAAUAAGGCUAGUCCGUUAU CAmAmCmUmUm GmAmAmAmAmAmGmUmGmG mCmAmCmCmGm AmGmUmCmGmGmUmGmCmU* mU*mU*mU	231
G009846	ACCUCACUCUUGUC UGGGGA GUUUUAGAGCUAG AAAUAGC AAGUUAAAUAAG GCUAGUC CGUUAUCAACUUG AAAAAGU GGCACCGAGUCGGU GCUUUU	199	mA*mC*mC*UCACUCUUGUCU GGGGAGUUUU AGAmGmCmUmAmGmAmAmA mUmAmGmCAA GUUAAAUAAGGCUAGUCCG UUAUCAmAmCm UmUmGmAmAmAmAmAmGmU mGmGmCmAmCm CmGmAmGmUmCmGmGmUmG mCmU*mU*mU*mU	232
G009847	CCUCACUCUUGUCU GGGGAA GUUUUAGAGCUAG	200	mC*mC*mU*CACUCUUGUCUG GGGAAGUUUUA GAmGmCmUmAmGmAmAmAm	233

	AAUAGC AAGUUAAAUAAG GCUAGUC CGUUAUCAACUUG AAAAAGU GGCACCGAGUCGGU GCUUUU		UmAmGmCAAGU UAAAAUAAGGCUAGUCCGUU AUCAmAmCmUm UmGmAmAmAmAmAmGmUmG mGmCmAmCmCm GmAmGmUmCmGmGmUmGmC mU*mU*mU*mU	
G009848	CUCACUCUUGUCUG GGAAG GUUUUAGAGCUAG AAUAGC AAGUUAAAUAAG GCUAGUC CGUUAUCAACUUG AAAAAGU GGCACCGAGUCGGU GCUUUU	201	mC*mU*mC*ACUCUUGUCUGG GGAAGGUUUU AGAmGmCmUmAmGmAmAmA mUmAmGmCAA GUUAAAUAAGGCUAGUCCG UUAUCAmAmCm UmUmGmAmAmAmAmAmGmU mGmGmCmAmCm CmGmAmGmUmCmGmGmUmG mCmU*mU*mU*mU	234
G009849	GGGGAAGGGGAGA AAAAAA GUUUUAGAGCUAG AAUAGC AAGUUAAAUAAG GCUAGUC CGUUAUCAACUUG AAAAAGU GGCACCGAGUCGGU GCUUUU	202	mG*mG*mG*GAAGGGGAGAAA AAAAAGUUUUAG AmGmCmUmAmGmAmAmAmU mAmGmCAAGUUAA AAUAAGGCUAGUCCGUUAUC AmAmCmUmUmGm AmAmAmAmAmGmUmGmGmC mAmCmCmGmAmGm UmCmGmGmUmGmCmU*mU*m U*mU	235
G009850	GGAAGGGGAGAA AAAAAA GUUUUAGAGCUAG AAUAGC AAGUUAAAUAAG GCUAGUC CGUUAUCAACUUG AAAAAGU	203	mG*mG*mG* AAGGGGAGAAAA AAAAAGUUUUAG AmGmCmUmAmGmAmAmAmU mAmGmCAAGUUAA AAUAAGGCUAGUCCGUUAUC AmAmCmUmUmGm AmAmAmAmAmGmUmGmGmC mAmCmCmGmAmGm	236

	GGCACCGAGUCGGU GCUUUU		UmCmGmGmUmGmCmU*mU*m U*mU	
G009851	AUGCAUUUGUUUC AAAAUUAU GUUUUAGAGCUAG AAAUAGC AAGUUAAAAUAAG GCUAGUC CGUUAUCAACUUG AAAAAGU GGCACCGAGUCGGU GCUUUU	35*	mA*mU*mG*CAUUUGUUUCA AAUAUGUUUUAG AmGmCmUmAmGmAmAmAmU mAmGmCAAGUUAA AAUAAGGCUAGUCCGUUAUC AmAmCmUmUmGm AmAmAmAmAmGmUmGmGmC mAmCmCmGmAmGm UmCmGmGmUmGmCmU*mU*m U*mU	67*
G009852	UGCAUUUGUUUCA AAAUUU GUUUUAGAGCUAG AAAUAGC AAGUUAAAAUAAG GCUAGUC CGUUAUCAACUUG AAAAAGU GGCACCGAGUCGGU GCUUUU	36*	mU*mG*mC*AUUUGUUUCAAA AUAUUGUUUUAG AmGmCmUmAmGmAmAmAmU mAmGmCAAGUUAA AAUAAGGCUAGUCCGUUAUC AmAmCmUmUmGm AmAmAmAmAmGmUmGmGmC mAmCmCmGmAmGm UmCmGmGmUmGmCmU*mU*m U*mU	68*
G009853	UGAUUCCUACAGA AAAAGUC GUUUUAGAGCUAG AAAUAGC AAGUUAAAAUAAG GCUAGUC CGUUAUCAACUUG AAAAAGU GGCACCGAGUCGGU GCUUUU	206	mU*mG*mA*UUCCUACAGAAA AAGUCGUUUUAG AmGmCmUmAmGmAmAmAmU mAmGmCAAGUUAA AAUAAGGCUAGUCCGUUAUC AmAmCmUmUmGm AmAmAmAmAmGmUmGmGmC mAmCmCmGmAmGm UmCmGmGmUmGmCmU*mU*m U*mU	239
G009854	UACAGAAAAAGUC AGGAUAA GUUUUAGAGCUAG	207	mU*mA*mC*AGAAAAAGUCAG GAUAAGUUUUAG AmGmCmUmAmGmAmAmAmU	240

	AAUAGC AAGUAAAAUAAG GCUAGUC CGUUAUCAACUUG AAAAAGU GGCACCGAGUCGGU GCUUUU		mAmGmCAAGUUA AAUAAGGCUAGUCCGUUAUC AmAmCmUmUmGm AmAmAmAmAmGmUmGmGmC mAmCmCmGmAmGm UmCmGmGmUmGmCmU*mU*m U*mU	
G009855	UUUCUUCUGCCUUU AAACAG GUUUUAGAGCUAG AAUAGC AAGUAAAAUAAG GCUAGUC CGUUAUCAACUUG AAAAAGU GGCACCGAGUCGGU GCUUUU	208	mU*mU*mU*CUUCUGCCUUUA AACAGGUUUUAG AmGmCmUmAmGmAmAmAmU mAmGmCAAGUUA AAUAAGGCUAGUCCGUUAUC AmAmCmUmUmGm AmAmAmAmAmGmUmGmGmC mAmCmCmGmAmGm UmCmGmGmUmGmCmU*mU*m U*mU	241
G009856	UUAUAGUUUUAUA UUCAAC GUUUUAGAGCUAG AAUAGC AAGUAAAAUAAG GCUAGUC CGUUAUCAACUUG AAAAAGU GGCACCGAGUCGGU GCUUUU	209	mU*mU*mA*UAGUUUUAUAU CAAACGUUUUAG AmGmCmUmAmGmAmAmAmU mAmGmCAAGUUA AAUAAGGCUAGUCCGUUAUC AmAmCmUmUmGm AmAmAmAmAmGmUmGmGmC mAmCmCmGmAmGm UmCmGmGmUmGmCmU*mU*m U*mU	242
G009857	AUUUAUGAGAUCA ACAGCAC GUUUUAGAGCUAG AAUAGC AAGUAAAAUAAG GCUAGUC CGUUAUCAACUUG AAAAAGU	37*	mA*mU*mU*UAUGAGAUCAAC AGCACGUUUUAG AmGmCmUmAmGmAmAmAmU mAmGmCAAGUUA AAUAAGGCUAGUCCGUUAUC AmAmCmUmUmGm AmAmAmAmAmGmUmGmGmC mAmCmCmGmAmGm	69*

	GGCACCGAGUCGGU GCUUUU		UmCmGmGmUmGmCmU*mU*m U*mU	
G009858	GAUCAACAGCACAG GUUUUG GUUUUAGAGCUAG AAAUAGC AAGUUAAAUAAG GCUAGUC CGUUAUCAACUUG AAAAAGU GGCACCGAGUCGGU GCUUUU	38*	mG*mA*mU*CAACAGCACAGG UUUUGGUUUUAG AmGmCmUmAmGmAmAmAmU mAmGmCAAGUUAA AAUAAGGCUAGUCCGUUAUC AmAmCmUmUmGm AmAmAmAmAmGmUmGmGmC mAmCmCmGmAmGm UmCmGmGmUmGmCmU*mU*m U*mU	70*
G009859	UUAAAUAAAGCAU AGUGCAA GUUUUAGAGCUAG AAAUAGC AAGUUAAAUAAG GCUAGUC CGUUAUCAACUUG AAAAAGU GGCACCGAGUCGGU GCUUUU	39*	mU*mU*mA*AAUAAAGCAUAG UGCAAGUUUUAG AmGmCmUmAmGmAmAmAmU mAmGmCAAGUUAA AAUAAGGCUAGUCCGUUAUC AmAmCmUmUmGm AmAmAmAmAmGmUmGmGmC mAmCmCmGmAmGm UmCmGmGmUmGmCmU*mU*m U*mU	71*
G009860	UAAAGCAUAGUGC AAUGGAU GUUUUAGAGCUAG AAAUAGC AAGUUAAAUAAG GCUAGUC CGUUAUCAACUUG AAAAAGU GGCACCGAGUCGGU GCUUUU	40*	mU*mA*mA*AGCAUAGUGCAA UGGAUGUUUUAG AmGmCmUmAmGmAmAmAmU mAmGmCAAGUUAA AAUAAGGCUAGUCCGUUAUC AmAmCmUmUmGm AmAmAmAmAmGmUmGmGmC mAmCmCmGmAmGm UmCmGmGmUmGmCmU*mU*m U*mU	72*
G009861	UAGUGCAAUGGAU AGGUCUU GUUUUAGAGCUAG	41*	mU*mA*mG*UGCAAUGGAUAG GUCUUGUUUUAG AmGmCmUmAmGmAmAmAmU	73*

	AAUAGC AAGUAAAAUAAG GCUAGUC CGUUAUCAACUUG AAAAAGU GGCACCGAGUCGGU GCUUUU		mAmGmCAAGUUA AAUAAGGCUAGUCCGUUAUC AmAmCmUmUmGm AmAmAmAmAmGmUmGmGmC mAmCmCmGmAmGm UmCmGmGmUmGmCmU*mU*m U*mU	
G009862	AGUGCAAUGGAUA GGUCUUA GUUUUAGAGCUAG AAUAGC AAGUAAAAUAAG GCUAGUC CGUUAUCAACUUG AAAAAGU GGCACCGAGUCGGU GCUUUU	215	mA*mG*mU*GCAAUGGAUAGG UCUUAGUUUUAG AmGmCmUmAmGmAmAmAmU mAmGmCAAGUUA AAUAAGGCUAGUCCGUUAUC AmAmCmUmUmGm AmAmAmAmAmGmUmGmGmC mAmCmCmGmAmGm UmCmGmGmUmGmCmU*mU*m U*mU	248
G009863	UUACUUUGCACUU UCCUUAG GUUUUAGAGCUAG AAUAGC AAGUAAAAUAAG GCUAGUC CGUUAUCAACUUG AAAAAGU GGCACCGAGUCGGU GCUUUU	216	mU*mU*mA*CUUUGCACUUUC CUUAGGUUUUAG AmGmCmUmAmGmAmAmAmU mAmGmCAAGUUA AAUAAGGCUAGUCCGUUAUC AmAmCmUmUmGm AmAmAmAmAmGmUmGmGmC mAmCmCmGmAmGm UmCmGmGmUmGmCmU*mU*m U*mU	249
G009864	UACUUUGCACUUUC CUUAGU GUUUUAGAGCUAG AAUAGC AAGUAAAAUAAG GCUAGUC CGUUAUCAACUUG AAAAAGU	217	mU*mA*mC*UUUGCACUUUC UUAGUGUUUUAG AmGmCmUmAmGmAmAmAmU mAmGmCAAGUUA AAUAAGGCUAGUCCGUUAUC AmAmCmUmUmGm AmAmAmAmAmGmUmGmGmC mAmCmCmGmAmGm	250

	GGCACCGAGUCGGU GCUUUU		UmCmGmGmUmGmCmU*mU*m U*mU	
G009865	UCUGACCUUUUAU UUUACCU GUUUUAGAGCUAG AAAUAGC AAGUUAAAUAAG GCUAGUC CGUUAUCAACUUG AAAAAGU GGCACCGAGUCGGU GCUUUU	218	mU*mC*mU*GACCUUUUAUUU UACCUGUUUUAG AmGmCmUmAmGmAmAmAmU mAmGmCAAGUUAA AAUAAGGCUAGUCCGUUAUC AmAmCmUmUmGm AmAmAmAmAmGmUmGmGmC mAmCmCmGmAmGm UmCmGmGmUmGmCmU*mU*m U*mU	251
G009866	UACUAAAACUUUA UUUUACU GUUUUAGAGCUAG AAAUAGC AAGUUAAAUAAG GCUAGUC CGUUAUCAACUUG AAAAAGU GGCACCGAGUCGGU GCUUUU	42*	mU*mA*mC*UAAAACUUUAUU UUACUGUUUUAG AmGmCmUmAmGmAmAmAmU mAmGmCAAGUUAA AAUAAGGCUAGUCCGUUAUC AmAmCmUmUmGm AmAmAmAmAmGmUmGmGmC mAmCmCmGmAmGm UmCmGmGmUmGmCmU*mU*m U*mU	74*
G009867	AAAGUUGAACAAU AGAAAAA GUUUUAGAGCUAG AAAUAGC AAGUUAAAUAAG GCUAGUC CGUUAUCAACUUG AAAAAGU GGCACCGAGUCGGU GCUUUU	43*	mA*mA*mA*GUUGAACAAUAG AAAAAGUUUUAG AmGmCmUmAmGmAmAmAmU mAmGmCAAGUUAA AAUAAGGCUAGUCCGUUAUC AmAmCmUmUmGm AmAmAmAmAmGmUmGmGmC mAmCmCmGmAmGm UmCmGmGmUmGmCmU*mU*m U*mU	75*
G009868	AAUGCAUAAUCUA AGUCAAA GUUUUAGAGCUAG	44*	mA*mA*mU*GCAUAAUCUAAG UCAAGUUUUAG AmGmCmUmAmGmAmAmAmU	76*

	AAAUAGC AAGUUA AAAUAAG GCUAGUC CGUUAUCAACUUG AAAAAGU GGCACCGAGUCGGU GCUUUU		mAmGmCAAGUUA AAUAAGGCUAGUCCGUUAUC AmAmCmUmUmGm AmAmAmAmAmGmUmGmGmC mAmCmCmGmAmGm UmCmGmGmUmGmCmU*mU*m U*mU	
G009869	AUUAUCCUGACUU UUUCUGU GUUUUAGAGCUAG AAAUAGC AAGUUA AAAUAAG GCUAGUC CGUUAUCAACUUG AAAAAGU GGCACCGAGUCGGU GCUUUU	222	mA*mU*mU*AUCCUGACUUUU UCUGUGUUUUAG AmGmCmUmAmGmAmAmAmU mAmGmCAAGUUA AAUAAGGCUAGUCCGUUAUC AmAmCmUmUmGm AmAmAmAmAmGmUmGmGmC mAmCmCmGmAmGm UmCmGmGmUmGmCmU*mU*m U*mU	255
G009870	UGAAUU AUUCCUC UGUUUAA GUUUUAGAGCUAG AAAUAGC AAGUUA AAAUAAG GCUAGUC CGUUAUCAACUUG AAAAAGU GGCACCGAGUCGGU GCUUUU	223	mU*mG*mA*AUUAUCCUCUG UUUAAGUUUUAG AmGmCmUmAmGmAmAmAmU mAmGmCAAGUUA AAUAAGGCUAGUCCGUUAUC AmAmCmUmUmGm AmAmAmAmAmGmUmGmGmC mAmCmCmGmAmGm UmCmGmGmUmGmCmU*mU*m U*mU	256
G009871	UAAUUUUCUUUUG CCCACUA GUUUUAGAGCUAG AAAUAGC AAGUUA AAAUAAG GCUAGUC CGUUAUCAACUUG AAAAAGU	224	mU*mA*mA*UUUUCUUUUGCC CACUAGUUUUAG AmGmCmUmAmGmAmAmAmU mAmGmCAAGUUA AAUAAGGCUAGUCCGUUAUC AmAmCmUmUm GmAmAmAmAmAmGmUmGmG mCmAmCmCmGm	257

	GGCACCGAGUCGGU GCUUUU		AmGmUmCmGmGmUmGmCmU* mU*mU*mU	
G009872	AAAAGGUCAGAAU UGUUUAG GUUUUAGAGCUAG AAAUAGC AAGUUAAAUAAG GCUAGUC CGUUAUCAACUUG AAAAAGU GGCACCGAGUCGGU GCUUUU	225	mA*mA*mA*AGGUCAGAAUUG UUUAGGUUUUAG AmGmCmUmAmGmAmAmAmU mAmGmCAAGUUAA AAUAAGGCUAGUCCGUUAUC AmAmCmUmUmGm AmAmAmAmAmGmUmGmGmC mAmCmCmGmAmGm UmCmGmGmUmGmCmU*mU*m U*mU	258
G009873	AACAUCCUAGGUA AAAUAAA GUUUUAGAGCUAG AAAUAGC AAGUUAAAUAAG GCUAGUC CGUUAUCAACUUG AAAAAGU GGCACCGAGUCGGU GCUUUU	226	mA*mA*mC*AUCCUAGGUA AUAAAGUUUUAG AmGmCmUmAmGmAmAmAmU mAmGmCAAGUUAA AAUAAGGCUAGUCCGUUAUC AmAmCmUmUmGm AmAmAmAmAmGmUmGmGmC mAmCmCmGmAmGm UmCmGmGmUmGmCmU*mU*m U*mU	259
G009874	UAAUAAAUAUCA ACAUCCU GUUUUAGAGCUAG AAAUAGC AAGUUAAAUAAG GCUAGUC CGUUAUCAACUUG AAAAAGU GGCACCGAGUCGGU GCUUUU	45*	mU*mA*mA*UAAAUAUCAAC AUCCUGUUUUAG AmGmCmUmAmGmAmAmAmU mAmGmCAAGUUAA AAUAAGGCUAGUCCGUUAUC AmAmCmUmUmGm AmAmAmAmAmGmUmGmGmC mAmCmCmGmAmGm UmCmGmGmUmGmCmU*mU*m U*mU	77*
G009875	UUGUCAUGUAUUU CUAAAUA GUUUUAGAGCUAG	228	mU*mU*mG*UCAUGUAUUUCU AAAUGUUUUAG AmGmCmUmAmGmAmAmAmU	261

	AAAUAGC AAGUAAAAUAAG GCUAGUC CGUUAUCAACUUG AAAAAGU GGCACCGAGUCGGU GCUUUU		mAmGmCAAGUUA AAUAAGGCUAGUCCGUUAUC AmAmCmUmUmGm AmAmAmAmAmGmUmGmGmC mAmCmCmGmAmGm UmCmGmGmUmGmCmU*mU*m U*mU	
G009876	UUUGUCAUGUAUU UCUAAAA GUUUUAGAGCUAG AAAUAGC AAGUAAAAUAAG GCUAGUC CGUUAUCAACUUG AAAAAGU GGCACCGAGUCGGU GCUUUU	229	mU*mU*mU*GUCAUGUAUUUC UAAAAGUUUUAG AmGmCmUmAmGmAmAmAmU mAmGmCAAGUUA AAUAAGGCUAGUCCGUUAUC AmAmCmUmUmGm AmAmAmAmAmGmUmGmGmC mAmCmCmGmAmGm UmCmGmGmUmGmCmU*mU*m U*mU	262

SEQ ID NO, обозначенные выше «*», означают, что указанная огРНК применима как к яванскому макаку, так и к человеку.

Таблица 14: Компоненты и последовательности векторов

ID плазмиды	5' ИКП	1-ая ориентация			2-ая ориентация			3' ИКП
		Акцептор сплай-синга	Трансген	Поли -А	Поли -А	Трансген	Акцептор сплай-синга	
P00415	(SEQ ID NO: 263)	Акцептор сплай-синга альбумина мыши (SEQ ID NO: 264)	Nluc-P2A-GFP (SEQ ID NO: 275)	SEQ ID NO: 266	SEQ ID NO: 267	Nluc-P2A-GFP (SEQ ID NO: 276)	Акцептор сплай-синга альбумина мыши (SEQ ID NO: 269)	(SEQ ID NO: 270)
P00450	(SEQ ID NO: 263)	Акцептор сплай-синга альбумина	SERPINA 1 человека (SEQ ID	SEQ ID NO: 266	SEQ ID NO: 267	SERPINA 1 человека (SEQ ID	Акцептор сплай-синга альбумина	(SEQ ID NO: 270)

		а мышь (SEQ ID NO: 264)	NO: 265)			NO: 268)	а мышь (SEQ ID NO: 269)	
--	--	----------------------------------	----------	--	--	----------	----------------------------------	--

5' ИКП последовательность (SEQ ID NO: 263):

TTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAA
GGTCGCCCCGACGCCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCA
GAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTCCCT

Акцептор сплайсинга альбумина мыши (1-ая ориентация) (SEQ ID NO: 264):

TAGGTCAAGTGAAGAGAAGAACAAGCAGCATATTACAGTTAGTTGTCTTC
ATCAATCTTTAAATATGTTGTGTGGTTTTTCTCTCCCTGTTTCCACAG

SERPINA1 человека, 1-ая ориентация (SEQ ID NO: 265):

GAGGACCCCCAGGGCGACGCCGCCAGAACACCGACACCAGCCACCACGAC
CAGGACCACCCACCTTCAACAAGATCACCCCAACCTGGCCGAGTTCGCCTTCAGC
CTGTACAGGCAGCTGGCCACCAGAGCAACAGCACCAACATCTTCTTCAGCCCCGTG
AGCATCGCCACCGCCTTCGCCATGCTGAGCCTGGGCACCAAGGCCGACACCCACGA
CGAGATCCTGGAGGGCCTGAACTTCAACCTGACCGAGATCCCCGAGGCCAGATCC
ACGAGGGCTTCCAGGAGCTGCTGAGGACCCTGAACCAGCCCCGACAGCCAGCTGCAG
CTGACCACCGGCAACGGCCTGTTCTGAGCGAGGGCCTGAAGCTGGTGGACAAGTT
CCTGGAGGACGTGAAGAAGCTGTACCACAGCGAGGCCTTCACCGTGAACCTTCGGCG
ACACCGAGGAGGCCAAGAAGCAGATCAACGACTACGTGGAGAAGGGCACCCAGGG
CAAGATCGTGGACCTGGTGAAGGAGCTGGACAGGGACACCGTGTTCGCCCTGGTGA
ACTACATCTTCTTCAAGGGCAAGTGGGAGAGGCCCTTCGAGGTGAAGGACACCGAG
GAGGAGGACTTCCACGTGGACCAGGTGACCACCGTGAAGGTGCCCATGATGAAGAG
GCTGGGCATGTTCAACATCCAGCACTGCAAGAAGCTGAGCAGCTGGGTGCTGCTGA
TGAAGTACCTGGGCAACGCCACCGCCATCTTCTTCCTGCCCGACGAGGGCAAGCTGC
AGCACCTGGAGAACGAGCTGACCCACGACATCATCACCAGTTCCTGGAGAACGAG
GACAGGAGGAGCGCCAGCCTGCACCTGCCAAGCTGAGCATCACCGGCACCTACGA
CCTGAAGAGCGTGCTGGGCCAGCTGGGCATCACCAGGTGTTTCAGCAACGGCGCCG
ACCTGAGCGGCGTGACCGAGGAGGCCCCCTGAAGCTGAGCAAGGCCGTGCACAAG
GCCGTGCTGACCATCGACGAGAAGGGCACCGAGGCCGCCGCGCCATGTTCCCTGGA
GGCCATCCCCATGAGCATCCCCCCCCGAGGTGAAGTTCAACAAGCCCTTCGTGTTCCCT
GATGATCGAGCAGAACACCAAGAGCCCCCTGTTTCATGGGCAAGGTGGTGAACCCCA
CCCAGAAGTAA

Поли-А bGH (1-ая ориентация) (SEQ ID NO: 266):

CCCTCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCTCCCCCGTGC
CTTCCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCACTGTCCCTTTCCTAATAAAATGAGGAAA
TTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGG
ACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGG
CTCTATGGCTTCTGAGGCGGAAAGAACCAGCTGGGGCTCTAGGGGGTATCCCC

Поли-А SV40 (2-ая ориентация) (SEQ ID NO: 267):

AAAAAACCTCCCACACCTCCCCCTGAACCTGAAACATAAAATGAATGCAATT
GTTGTTGTTAACTTGTTTATTGCAGCTTATAATGGTTACAAATAAAGCAATAGCATC
ACAAATTTACAAATAAAGCATTTTTTTTCACTGCATTCTAGTTGTGGTTTGTCCAAAC
TCATCAATGTATCTTATCATGTCTG

SERPINA1 человека, 2-ая ориентация (SEQ ID NO: 268):

GAGGATCCCCAGGGAGATGCTGCCCAGAAGACAGATACATCCCACCATGATC
AGGATCACCCAACCTTCAACAAGATCACCCCCAACCTGGCTGAGTTCGCCTTCAGCC
TATACCGCCAGCTGGCACACCAGTCCAACAGCACCAATATCTTCTTCTCCCCAGTGA
GCATCGCTACAGCCTTTGCAATGCTCTCCCTGGGGACCAAGGCTGACACTCACGATG
AAATCCTGGAGGGCCTGAATTTCAACCTCACGGAGATTCCGGAGGCTCAGATCCAT
GAAGGCTTCCAGGAACTCCTCCGTACCCTCAACCAGCCAGACAGCCAGCTCCAGCT
GACCACCGGCAATGGCCTGTTCCCTCAGCGAGGGCCTGAAGCTAGTGGATAAGTTTTT
GGAGGATGTTAAAAAGTTGTACCACTCAGAAGCCTTCACTGTCAACTTCGGGGACA
CCGAAGAGGCCAAGAAACAGATCAACGATTACGTGGAGAAGGGTACTCAAGGGAA
AATTGTGGATTTGGTCAAGGAGCTTGACAGAGACACAGTTTTTGTCTCTGGTGAATTA
CATCTTCTTTAAAGGCAAATGGGAGAGACCCTTTGAAGTCAAGGACACCGAGGAAG
AGGACTTCCACGTGGACCAGGTGACCACCGTGAAGGTGCCTATGATGAAGCGTTTA
GGCATGTTTAAACATCCAGCACTGTAAGAAGCTGTCCAGCTGGGTGCTGCTGATGAAA
TACCTGGGCAATGCCACCGCCATCTTCTTCCCTGCCTGATGAGGGGAAACTACAGCAC
CTGGAAAATGAACTCACCCACGATATCATCACCAAGTTCCTGGAAAATGAAGACAG
AAGGTCTGCCAGCTTACATTTACCCAAACTGTCCATTACTGGAACCTATGATCTGAA
GAGCGTCTGGGTCAACTGGGCATCACTAAGGTCTTCAGCAATGGGGCTGACCTCTC
CGGGGTCACAGAGGAGGCACCCCTGAAGCTCTCCAAGGCCGTGCATAAAGGCTGTGC
TGACCATCGACGAGAAAGGGACTGAAGCTGCTGGGGCCATGTTTTTAGAGGCCATA
CCCATGTCTATCCCCCGAGGTCAAGTTCAACAAACCCTTTGTCTTCTTAATGATTG
AACAAAATACCAAGTCTCCCCTCTTCATGGGAAAAGTGGTGAATCCCACCCAAAAAT
aa

Акцептор сплайсинга альбумина мыши (2-ая ориентация) (SEQ ID NO: 269):

CTGTGGAAACAGGGAGAGAAAAACCACACAACATATTTAAAGATTGATGAA
GACAACTAACTGTAATATGCTGCTTTTTGTTCTTCTTCACTGACCTA

3' ИКП последовательность (SEQ ID NO: 270):

AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTC
ACTGAGGCCGCCGGGCAAAGCCCGGGCGTCGGGCGACCTTTGGTCGCCCGGCCTC
AGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAA

Nluc-P2A-GFP (1-ая ориентация) (SEQ ID NO: 275):

TTTCTTGATCATGAAAACGCCAACAAAATTCTGAATCGGCCAAAGAGGTATA
ATTCAGGTAААТТGGAAGAGTTTGTTCАAGGGAACCTTGAGAGAGAATGTATGGAA
GAAAAGTGTAGTTTTGAAGAAGCAGTATCACTTTGGAGGACTTTGTCTGGTACTGG
AGGCAAACCGCTGGTTATAATCTCGACCAAGTACTGGAACAGGGCGGGGTAAGTTC

CCTCTTTCAGAATTTGGGTGTAAGCGTCACACCAATCCAGCGGATTGTGTTGTCTGG
 AGAGAACGGACTCAAAATTGACATCCATGTTATCATTCCATATGAAGGTCTCAGTGG
 AGACCAAATGGGGCAGATCGAGAAGATTTTCAAGGTAGTTTACCCAGTCGACGATC
 ACCACTTCAAAGTCATTCTCCACTATGGCACACTTGTTATCGACGGAGTAACTCCTA
 ATATGATTGATTACTTTGGTCGCCCCGTATGAGGGCATCGCAGTGTTTGATGGCAAAA
 AGATCACCGTAACAGGAACGTTGTGGAATGGGAACAAGATAATCGACGAGAGATTG
 ATAAATCCAGACGGGTCCTCCTGTTTCAGGGTTACAATTAACGGCGTCACAGGATG
 GAGACTCTGTGAACGAATACTGGCCACAAATTTTCACTCCTGAAGCAGGCCGGAG
 ACGTGGAGGAAAACCCAGGGCCCCGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCCGGGGT
 GGTGCCCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGT
 CCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGC
 ACCACCGGCAAGCTGCCCCGTGCCCTGGCCCCACCCTCGTGACCACCCTGACCTACGGC
 GTGCAGTGCTTCAGCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCACGACTTCTTCAAGTCC
 GCCATGCCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAA
 CTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCG
 AGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAG
 TACAATAACAACAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCAT
 CAAGGTGAACTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCG
 ACCACTACCAGCAGAACACCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCCCGACAAC
 CACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCA
 CATGGTCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCT
 GTACAAGGGAGGAGGAAGCCCGAAGAAGAAGAGAAAGGTCTAA

Nluc-P2A-GFP (2-ая ориентация) (SEQ ID NO: 276):

TTACACCTTCCTCTTCTTGGGGCTGCCGCCGCCCTTGACAGCTCGTCCAT
 GCCCAGGGTGATGCCGGCGGGGTCACGAACCTCCAGCAGCACCATGTGGTCCCTCTT
 CTCGTTGGGGTCCTTGCTCAGGGCGCTCTGGGTGCTCAGGTAGTGGTTGTCGGGCAG
 CAGCACGGGGCCGTCGCCGATGGGGGTGTTCTGCTGGTAGTGGTCCGGCCAGCTGCA
 CGCTGCCGTCCTCGATGTTGTGCCTGATCTTGAAGTTCACCTTGATGCCGTTCTTCTG
 CTTGTCGGCCATGATGTACACGTTGTGGCTGTTGTAGTTGTACTCCAGCTTGTGGCCC
 AGGATGTTGCCGTCTCCTTGAAGTCGATGCCCTTCAGCTCGATCCTGTTACCAGG
 GTGTCGCCCTCGAACTTCACCTCGGCCCTGGTCTTGTAGTTGCCGTCGTCCTTGAAGA
 AGATGGTCTCTCCTGCACGTAGCCCTCGGGCATGGCGCTCTTGAAGAAGTCGTGCT
 GCTTCATGTGGTCGGGGTACCTGCTGAAGCACTGCACGCCGTAGGTTCAGGGTGGTCA
 CCAGGGTGGGCCAGGGCACGGGCAGCTTGCCGGTGGTGCAGATGAACTTCAGGGTC
 AGCTTGCCGTAGGTGGCGTCGCCCTCGCCCTCGCCGCTCACGCTGAACTTGTGGCCG
 TTCACGTCGCCGTCCAGCTCCACCAGGATGGGCACCACGCCGGTGAACAGCTCCTCG
 CCCTTGCTCACGGGGCCGGGGTTCTCCTCCACGTCGCCGGCCTGCTTCAGCAGGCTG
 AAGTTGGTGGCCAGGATCCTCTCGCACAGCCTCCAGCCGGTCACGCCGTTGATGGTC
 ACCCTGAACAGCAGGCTGCCGTCGGGGTTGATCAGCCTCTCGTCGATGATCTTGTG
 CCGTTCCACAGGGTGCCGGTCACGGTGATCTTCTTGCCGTCGAACACGGCGATGCC

TCGTAGGGCCTGCCGAAGTAGTCGATCATGTTGGGGGTCACGCCGTCGATCACCAG
GGTGCCGTAGTGCAGGATCACCTTGAAGTGGTGGTCGTCCACGGGGTACACCACCTT
GAAAATCTTCTCGATCTGGCCATCTGGTCGCCGCTCAGGCCCTCGTAGGGGATGAT
CACGTGGATGTCGATCTTCAGGCCGTTCTCGCCGCTCAGCACGATCCTCTGGATGGG
GGTCACGCTCACGCCAGGTTCTGGAACAGGCTGCTCACGCCGCCCTGCTCCAGCAC
CTGGTCCAGGTTGTAGCCGGCGGTCTGCCTCCAGTCGCCACGAAGTCCTCCAGGGT
GAACACGGCCTCCTCGAAGCTGCACTTCTCCTCCATGCACTCCCTCTCCAGGTTGCC
CTGCACGAACTCCTCCAGCTTGCCGCTGTTGTACCTCTTGGGCCTGTTCAGGATCTTG
TTGGCGTTCTCGTGGTCCAGGAA

Полная последовательность P00415 (от ИКП до ИКП): (SEQ ID NO: 279)

TTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAA
GGTCGCCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCA
GAGAGGGAGTGCCAACTCCATCACTAGGGGTTCTAGATCTCTTAGGTCAGTGAA
GAGAAGAACAAAAAGCAGCATATTACAGTTAGTTGTCTTCATCAATCTTTAAATATG
TTGTGTGGTTTTTCTCTCCCTGTTTCCACAGTTTTTCTTGATCATGAAAACGCCAACA
AAATTCTGAATCGGCCAAAGAGGTATAATTCAGGTAAATTGGAAGAGTTTGTTCAA
GGGAACCTTGAGAGAGAATGTATGGAAGAAAAGTGTAGTTTTGAAGAAGCAGTATT
CACTTTGGAGGACTTTGTCTGGTACTGGAGGCAAACCGCTGGTTATAATCTCGACCA
AGTACTGGAACAGGGCGGGGTAAGTTCCTCTTTCAGAATTTGGGTGTAAGCGTCAC
ACCAATCCAGCGGATTGTGTTGTCTGGAGAGAACGGACTCAAATGACATCCATGT
TATCATTCCATATGAAGGTCTCAGTGGAGACCAAATGGGGCAGATCGAGAAGATTT
TCAAGGTAGTTTACCCAGTCGACGATCACCCTTCAAAGTCATTCTCCACTATGGCA
CACTTGTATCGACGGAGTAACTCCTAATATGATTGATTACTTTGGTCGCCCGTATG
AGGGCATCGCAGTGTTTGATGGCAAAAAGATCACCGTAACAGGAACGTTGTGGAAT
GGGAACAAGATAATCGACGAGAGATTGATAAATCCAGACGGGTCCTCCTGTTTCAG
GGTTACAATTAACGGCGTCACAGGATGGAGACTCTGTGAACGAATACTGGCCACAA
ATTTTTCACTCCTGAAGCAGGCCGGAGACGTGGAGGAAAACCCAGGGCCCCGTGAGC
AAGGGCGAGGAGCTGTTACCCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGA
CGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACG
GCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCCA
CCCTCGTGACCACCCTGACCTACGGCGTGCAGTGCTTCAGCCGCTACCCCGACCACA
TGAAGCAGCACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGC
ACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGA
GGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACG
GCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACACTACAACAGCCACAACGTCTATATC
ATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACTTCAAGATCCGCCACAACAT
CGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCATCGGCG
ACGGCCCCGTGCTGCTGCCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCA
AAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCC
GGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGGGAGGAGGAAGCCCGAAGAAGA

AGAGAAAGGTCTAACCTCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCC
 CTCCCCCGTGCCTTCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCCTGTCCTTTCCTAATAA
 AATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGG
 GTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGG
 ATGCGGTGGGCTCTATGGCTTCTGAGGCGGAAAGAACCAGCTGGGGCTCTAGGGGG
 TATCCCCAAAAACCTCCCACACCTCCCCCTGAACCTGAAACATAAAATGAATGCA
 ATTGTTGTTGTTAACTTGTTTATTGCAGCTTATAATGGTTACAAATAAAGCAATAGC
 ATCACAAATTTACAAATAAAGCATTTTTTTCACTGCATTCTAGTTGTGGTTTGTCCA
 AACTCATCAATGTATCTTATCATGTCTGTTACACCTTCCTCTTCTTGGGGCTGCC
 GCCGCCCTTGACAGCTCGTCCATGCCAGGGTGATGCCGGCGGGCGGTCACGAACTC
 CAGCAGCACCATGTGGTCCCTCTTCTCGTTGGGGTCCCTTGCTCAGGGCGCTCTGGGT
 GCTCAGGTAGTGGTTGTCTGGGCAGCAGCACGGGGCCGTCGCCGATGGGGGTGTTCT
 GCTGGTAGTGGTCTGGCCAGCTGCACGCTGCCGTCCTCGATGTTGTGCCTGATCTTGA
 AGTTCACCTTGATGCCGTTCTTCTGCTTGTCTGGCCATGATGTACACGTTGTGGCTGT
 GTAGTTGTACTCCAGCTTGTGGCCAGGATGTTGCCGTCCTCCTTGAAGTCGATGCC
 CTTACAGCTCGATCCTGTTACACAGGGTGTCGCCCTCGAACTTCACCTCGGCCCTGGTC
 TTGTAGTTGCCGTCGTCCTTGAAGAAGATGGTCCCTCCTGCACGTAGCCCTCGGGC
 ATGGCGCTCTTGAAGAAGTCGTGCTGCTTCATGTGGTCTGGGGTACCTGCTGAAGCAC
 TGCACGCCGTAGGTGAGGGTGGTACCAGGGTGGGCCAGGGCACGGGCAGCTTGCC
 GGTGGTGCAGATGAACTTCAGGGTCCAGCTTGCCGTAGGTGGCGTCGCCCTCGCCCTC
 GCCGCTCACGCTGAACTTGTGGCCGTTACGTCGCCGTCCAGCTCCACCAGGATGGG
 CACCACGCCGGTGAACAGCTCCTCGCCCTTGCTCACGGGGCCGGGGTTCTCCTCCAC
 GTCGCCGGCCTGCTTCAGCAGGCTGAAGTTGGTGGCCAGGATCCTCTCGCACAGCCT
 CCAGCCGGTCCAGCCGTTGATGGTCCACCTGAACAGCAGGCTGCCGTCGGGGTTGAT
 CAGCCTCTCGTCGATGATCTTGTGGCCGTTCCACAGGGTGCCGGTCCAGGTGATCTT
 CTTGCCGTCGAACACGGCGATGCCCTCGTAGGGCCTGCCGAAGTAGTCGATCATGTT
 GGGGGTCCAGCCGTCGATCACCAGGGTGGCGTAGTGCAGGATCACCTTGAAGTGGT
 GGTCGTCCACGGGGTACACCACCTTGAATAATCTTCTCGATCTGGCCATCTGGTCGC
 CGCTCAGGCCCTCGTAGGGGATGATCACGTGGATGTCGATCTTACAGGCCGTTCTCGC
 CGCTCAGCACGATCCTCTGGATGGGGTCCAGCTCACGCCAGGTTCTGGAACAGG
 CTGCTCACGCCGCCCTGCTCCAGCACCTGGTCCAGGTTGTAGCCGGCGGTCTGCCTC
 CAGTCGCCACGAAGTCCCTCCAGGGTGAACACGGCCTCCTCGAAGCTGCACTTCTCC
 TCCATGCACTCCCTCTCCAGGTTGCCCTGCACGAACTCCTCCAGCTTGCCGCTGTTGT
 ACCTCTTGGGCCTGTTACAGGATCTTGTGGCGTTCTCGTGGTCCAGGAA

P00450 SEQ ID NO: 289

TTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAA
 GGTCGCCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCA
 GAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTCTAGATCTACTAGTtaggtcagtgaga
 gaagaacaaaaagcagcatattacagtagtgtcttcatcaatcttaaatatggtgtgtgtttctctccctgttccacagttGAGGAC
 CCCCAGGGCGACGCCGCCAGAAGACCGACACCAGCCACCACGACCAGGACCACCC

CACCTTCAACAAGATCACCCCCAACCTGGCCGAGTTCGCCTTCAGCCTGTACAGGCA
GCTGGCCCACCAGAGCAACAGCACCAACATCTTCTTCAGCCCCGTGAGCATCGCCAC
CGCCTTCGCCATGCTGAGCCTGGGCACCAAGGCCGACACCCACGACGAGATCCTGG
AGGGCCTGAACTTCAACCTGACCGAGATCCCCGAGGCCAGATCCACGAGGGCTTC
CAGGAGCTGCTGAGGACCCTGAACCAGCCCGACAGCCAGCTGCAGCTGACCACCGG
CAACGGCCTGTTCTGAGCGAGGGCCTGAAGCTGGTGGACAAGTTCCTGGAGGACG
TGAAGAAGCTGTACCACAGCGAGGCCTTCACCGTGAACCTCGGGCAGACCCGAGGAG
GCCAAGAAGCAGATCAACGACTACGTGGAGAAGGGCACCCAGGGCAAGATCGTGG
ACCTGGTGAAGGAGCTGGACAGGGACACCGTGTTTCGCCCTGGTGAACCTACATCTTCT
TCAAGGGCAAGTGGGAGAGGCCCTTCGAGGTGAAGGACACCGAGGAGGAGGACTT
CCACGTGGACCAGGTGACCACCGTGAAGGTGCCCATGATGAAGAGGCTGGGCATGT
TCAACATCCAGCACTGCAAGAAGCTGAGCAGCTGGGTGCTGCTGATGAAGTACCTG
GGCAACGCCACCGCCATCTTCTTCCTGCCCGACGAGGGCAAGCTGCAGCACCTGGA
GAACGAGCTGACCCACGACATCATCACCAGTTCCTGGAGAACGAGGACAGGAGGA
GCGCCAGCCTGCACCTGCCAAGCTGAGCATCACCGGCACCTACGACCTGAAGAGC
GTGCTGGGCCAGCTGGGCATCACCAGGTGTTTCAGCAACGGCGCCGACCTGAGCGG
CGTGACCGAGGAGGCCCCCTGAAGCTGAGCAAGGCCGTGCACAAGGCCGTGCTGA
CCATCGACGAGAAGGGCACCGAGGCCGCCGGCGCCATGTTCTGGAGGCCATCCCC
ATGAGCATCCCCCCCCGAGGTGAAGTTCAACAAGCCCTTCGTGTTCTGATGATCGAG
CAGAACACCAAGAGCCCCCTGTTTCATGGGCAAGGTGGTGAACCCACCCAGAAGTA
ACAGACATGATAAGATAACATTGATGAGTTTGGACAAACCACAACCTAGAATGCAGTG
AAAAAATGCTTTATTTGTGAAATTTGTGATGCTATTGCTTTATTTGTAACCATTATA
AGCTGCAATAAACAAGTTAACAACAACAATTGCATTCATTTTATGTTTCAGGTTTCAG
GGGGAGGTGTGGGAGGTTTTTTggggataccccctagagccccagctggttctttccgcctcagaagccatagagccc
accgeatccccagcatgctgctattgtcttcccaatcctcccccttctgtctctccccccccccccagaatagaatgacacctactc
agacaatgcatgcaatttctcattttattaggaaggacagtgaggagtgccacctccagggtcaaggaaggcacgggggaggggcaa
acaacagatggtggcaactagaaggcacagtcgaggttaTTTTTGGGTGGGATTACCACTTTTCCCATGA
AGAGGGGAGACTTGGTATTTTGTTCATCATTAAAGAAGACAAAGGGTTTGTGAACT
TGACCTCGGGGGGGATAGACATGGGTATGGCCTCTAAAAACATGGCCCCAGCAGCT
TCAGTCCCTTTCTCGTCGATGGTCAGCACAGCCTTATGCACGGCCTTGGAGAGCTTC
AGGGGTGCCTCCTCTGTGACCCCGGAGAGGTCAGCCCCATTGCTGAAGACCTTAGTG
ATGCCAGTTGACCCAGGACGCTCTTCAGATCATAGGTTCCAGTAATGGACAGTTTG
GGTAAATGTAAGCTGGCAGACCTTCTGTCTTCATTTTCCAGGAACCTGGTGATGATA
TCGTGGGTGAGTTCATTTTCCAGGTGCTGTAGTTTCCCCTCATCAGGCAGGAAGAAG
ATGGCGGTGGCATTGCCAGGTATTTTCATCAGCAGCACCCAGCTGGACAGCTTCTTA
CAGTGCTGGATGTTAAACATGCCTAAACGCTTCATCATAGGCACCTTCACGGTGGTC
ACCTGGTCCACGTGGAAGTCCTCTTCTCGGTGTCCTTGACTTCAAAGGGTCTCTCCC
ATTTGCCTTTAAAGAAGATGTAATTCACCAGAGCAAAAACCTGTGTCTCTGTCAAGCT
CCTTGACCAAATCCACAATTTTCCCTTGAGTACCCTTCTCCACGTAATCGTTGATCTG
TTTCTTGGCCTCTTCGGTGTCCCCGAAGTTGACAGTGAAGGCTTCTGAGTGGTACAA

CTTTTAAACATCCTCCAAAACTTATCCACTAGCTTCAGGCCCTCGCTGAGGAACAG
GCCATTGCCGGTGGTCAGCTGGAGCTGGCTGTCTGGCTGGTTGAGGGTACGGAGGA
GTTCTGGAAGCCTTCATGGATCTGAGCCTCCGGAATCTCCGTGAGGTTGAAATTCA
GGCCCTCCAGGATTCATCGTGAGTGTGAGCCTTGGTCCCCAGGGAGAGCATTGCAA
AGGCTGTAGCGATGCTCACTGGGGAGAAGAAGATATTGGTGCTGTTGGACTGGTGT
GCCAGCTGGCGGTATAGGCTGAAGGCGAACTCAGCCAGGTTGGGGGTGATCTTGTT
GAAGGTTGGGTGATCCTGATCATGGTGGGATGTATCTGTCTTCTGGGCAGCATCTCC
CTGGGGATCCTCaactgtgaaacaggagagaaaaaccacacaacatatttaaagattgatgaagacaactaactgtaatgc
tgcttttgtctctctctcactgacctaACTAGTAGATCTAGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACT
CCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCGGGCGTCGG
GCGACCTTTGGTCGCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGC
CAA

Последовательность сигнального пептида альбумина SEQ ID NO: 2000

MKWVTFISLLFLFSSAYS

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ внесения нуклеиновой кислоты SERPINA1 в клетку или популяцию клеток, включающий введение

i) конструкции нуклеиновой кислоты, содержащей кодирующую последовательность гетерологичного белка ААТ;

ii) РНК-направляемого ДНК-связывающего агента; и

iii) гидовой РНК (гРНК) альбумина, содержащей последовательность, выбранную из:

a) последовательности, которая по меньшей мере на 95%, 90%, 85%, 80% или 75% идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 8, 13, 19, 28, 29, 31, 32, 33;

b) по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 8, 13, 19, 28, 29, 31, 32, 33;

c) последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 34, 40, 45, 51, 60, 61, 63, 64, 65, 66, 72, 77, 83, 92, 93, 95, 96 и 97;

d) последовательности, которая по меньшей мере на 95%, 90%, 85%, 80% или 75% идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2-33;

e) по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2-33;

f) последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 34-97; и

g) последовательности, комплементарной 15 последовательным нуклеотидам +/- 10 нуклеотидам геномных координат, приведенных для SEQ ID NO: 2-33,

с внесением, таким образом, нуклеиновой кислоты SERPINA1 в клетку или популяцию клеток.

2. Способ экспрессии ААТ у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение

i) конструкции нуклеиновой кислоты, содержащей кодирующую последовательность гетерологичного белка ААТ;

ii) РНК-направляемого ДНК-связывающего агента; и

iii) гидовой РНК (гРНК) альбумина, содержащей последовательность, выбранную из:

a) последовательности, которая по меньшей мере на 95%, 90%, 85%, 80% или 75% идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 8, 13, 19, 28, 29, 31, 32, 33;

b) по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 8, 13, 19, 28, 29, 31, 32, 33;

c) последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 34, 40, 45, 51, 60, 61, 63, 64, 65, 66, 72, 77, 83, 92, 93, 95, 96 и 97;

d) последовательности, которая по меньшей мере на 95%, 90%, 85%, 80% или 75% идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2-33;

e) по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2-33;

f) последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 34-97; и

g) последовательности, комплементарной 15 последовательным нуклеотидам +/- 10 нуклеотидам геномных координат, приведенных для SEQ ID NO: 2-33,

с обеспечением, таким образом, экспрессии ААТ у нуждающегося в этом субъекта.

3. Способ лечения дефицита альфа-1-антитрипсина (ААТД) у субъекта, нуждающегося в белке ААТ, включающий введение:

i) конструкции нуклеиновой кислоты, содержащей кодирующую последовательность гетерологичного белка ААТ;

ii) РНК-направляемого ДНК-связывающего агента; и

iii) гидовой РНК (гРНК) альбумина, содержащей последовательность, выбранную из:

a) последовательности, которая по меньшей мере на 95%, 90%, 85%, 80% или 75% идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 8, 13, 19, 28, 29, 31, 32, 33;

b) по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 8, 13, 19, 28, 29, 31, 32, 33;

c) последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 34, 40, 45, 51, 60, 61, 63, 64, 65, 66, 72, 77, 83, 92, 93, 95, 96 и 97;

d) последовательности, которая по меньшей мере на 95%, 90%, 85%, 80% или 75% идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2-33;

e) по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2-33;

f) последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 34-97; и

g) последовательности, комплементарной 15 последовательным нуклеотидам +/- 10 нуклеотидам геномных координат, приведенных для SEQ ID NO: 2-33,

осуществляя, таким образом, лечение ААТД у субъекта.

4. Способ повышения секреции ААТ из клетки или популяции клеток печени, включающий введение

i) конструкции нуклеиновой кислоты, содержащей кодирующую последовательность гетерологичного белка ААТ;

ii) РНК-направляемого ДНК-связывающего агента; и

iii) гидовой РНК (гРНК) альбумина, содержащей последовательность, выбранную из:

a) последовательности, которая по меньшей мере на 95%, 90%, 85%, 80% или 75% идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 8, 13, 19, 28, 29, 31, 32, 33;

b) по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 8, 13, 19, 28, 29, 31, 32, 33;

с) последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 34, 40, 45, 51, 60, 61, 63, 64, 65, 66, 72, 77, 83, 92, 93, 95, 96 и 97;

d) последовательности, которая по меньшей мере на 95%, 90%, 85%, 80% или 75% идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2-33;

e) по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2-33;

f) последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 34-97; и

g) последовательности, комплементарной 15 последовательным нуклеотидам +/- 10 нуклеотидам геномных координат, приведенных для SEQ ID NO: 2-33,

обеспечивая, таким образом, повышение секреции ААТ из клетки или популяции клеток печени.

5. Способ по любому одному из пп. 1-4, отличающийся тем, что способ дополнительно включает индукцию двухцепочечного разрыва (ДЦР) в эндогенном гене SERPINA1.

6. Способ по любому одному из пп. 1-4, отличающийся тем, что способ дополнительно включает модификацию эндогенного гена SERPINA1.

7. Способ по п. 5 или п. 6, отличающийся тем, что в эндогенном гене SERPINA1 индуцируют ДЦР и/или эндогенный ген SERPINA1 модифицируют до или после введения конструкции нуклеиновой кислоты, содержащей кодирующую последовательность гетерологичного белка ААТ, РНК-направляемый ДНК-связывающий агент и гРНК альбумина.

8. Способ по любому одному из пп. 1-7, отличающийся тем, что способ дополнительно включает введение гидовой РНК SERPINA1, которая является по меньшей мере частично комплементарной целевой последовательности, представленной в экзоне 2, 3, 4 или 5 эндогенного гена SERPINA1 человека.

9. Способ по п. 8, отличающийся тем, что гидовая РНК SERPINA1 содержит направляющую последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1000-1128, или направляющую последовательность, которая по меньшей мере на 95%, 90%, 85%, 80% или 75% идентична 17, 18, 19 и/или 20 последовательным нуклеотидам последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 1000-1128.

10. Способ по п. 8, отличающийся тем, что способ дополнительно включает введение РНК-направляемого ДНК-связывающего агента с гидовой РНК SERPINA1.

11. Способ по п. 8, отличающийся тем, что негомологичное соединение концов (НГСК) приводит к мутации во время репарации ДЦР в эндогенном гене SERPINA1.

12. Способ по п. 11, отличающийся тем, что НГСК приводит к удалению или вставке нуклеотида(ов) во время репарации ДЦР в эндогенном гене SERPINA1.

13. Способ по п. 12, отличающийся тем, что удаление или вставка нуклеотида(ов) индуцирует сдвиг рамки или нонсенс-мутацию в эндогенном гене SERPINA1.

14. Способ по любому одному из пп. 1-13, отличающийся тем, что введение осуществляют *in vitro*.

15. Способ по любому одному из пп. 1-13, отличающийся тем, что введение осуществляют *in vivo*.

16. Способ по любому одному из пп. 1-15, отличающийся тем, что гРНК альбумина содержит направляющую последовательность, содержащую последовательность, выбранную из

а) последовательности, которая по меньшей мере на 95%, 90%, 85%, 80% или 75% идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 8, 13, 19, 28, 29, 31, 32, 33;

б) по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 8, 13, 19, 28, 29, 31, 32, 33;

с) последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 34, 40, 45, 51, 60, 61, 63, 64, 65, 66, 72, 77, 83, 92, 93, 95, 96 и 97.

17. Способ по любому одному из пп. 1-16, отличающийся тем, что конструкцию нуклеиновой кислоты вводят в векторе нуклеиновой кислоты и/или липидной наночастице.

18. Способ по любому одному из пп. 1-17, отличающийся тем, что РНК-направляемый ДНК-связывающий агент и/или гРНК альбумина вводят в векторе нуклеиновой кислоты и/или липидной наночастице.

19. Способ по любому одному из пп. 1-18, отличающийся тем, что РНК-направляемый ДНК-связывающий агент и/или гРНК SERPINA1 вводят в векторе нуклеиновой кислоты и/или липидной наночастице.

20. Способ по любому одному из пп. 17-19, отличающийся тем, что вектор нуклеиновой кислоты представляет собой вирусный вектор.

21. Способ по п. 20, отличающийся тем, что вирусный вектор выбран из группы, состоящей из аденоассоциированного вирусного (AAV) вектора, аденовирусного вектора, ретровирусного вектора и лентивирусного вектора.

22. Способ по п. 21, отличающийся тем, что AAV-вектор выбран из группы, состоящей из AAV1, AAV2, AAV3, AAV3B, AAV4, AAV5, AAV6, AAV6.2, AAV7, AAVrh.64R1, AAVhu.37, AAVrh.8, AAVrh.32.33, AAV8, AAV9, AAV-DJ, AAV2/8, AAVrh10, AAVLK03, AV10, AAV11, AAV12, rh10 и их гибридов.

23. Способ по любому одному из пп. 1-22, отличающийся тем, что конструкцию нуклеиновой кислоты, РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, гРНК альбумина и гРНК SERPINA1 вводят последовательно, в любом порядке и/или в любой комбинации.

24. Способ по любому одному из пп. 1-23, отличающийся тем, что конструкцию нуклеиновой кислоты, РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, гРНК альбумина и гРНК SERPINA1, отдельно или в любой комбинации, вводят одновременно.

25. Способ по любому одному из пп. 1-24, отличающийся тем, что РНК-направляемый ДНК-связывающий агент или РНК-направляемый ДНК-связывающий агент и гРНК альбумина в комбинации вводят до введения конструкции нуклеиновой кислоты.

26. Способ по любому одному из пп. 1-25, отличающийся тем, что конструкцию

нуклеиновой кислоты вводят до введения гРНК альбумина и/или РНК-направляемого ДНК-связывающего агента.

27. Способ по любому одному из пп. 1-26, отличающийся тем, что РНК-направляемый ДНК-связывающий агент представляет собой Cas-нуклеазу класса 2.

28. Способ по п. 27, отличающийся тем, что Cas-нуклеаза представляет собой Cas9-нуклеазу.

29. Способ по п. 28, отличающийся тем, что Cas9-нуклеаза представляет собой Cas9-нуклеазу *S. pyogenes*.

30. Способ по любому одному из пп. 28-30, отличающийся тем, что Cas-нуклеаза представляет собой кливазу (cleavase).

31. Способ по любому одному из пп. 28-30, отличающийся тем, что Cas-нуклеаза представляет собой никазу.

32. Способ по любому одному из пп. 1-31, отличающийся тем, что конструкция нуклеиновой кислоты представляет собой двунаправленную конструкцию нуклеиновой кислоты.

33. Способ по любому одному из пп. 1-32, отличающийся тем, что конструкция нуклеиновой кислоты является одноцепочечной или двухцепочечной.

34. Способ по любому одному из пп. 1-33, отличающийся тем, что конструкция нуклеиновой кислоты представляет собой одноцепочечную ДНК или двухцепочечную ДНК.

35. Способ по любому одному из пп. 1-34, отличающийся тем, что двунаправленная конструкция не содержит промотор, который управляет экспрессией гетерологичного белка ААТ.

36. Способ по любому одному из пп. 21-35, отличающийся тем, что уровень функционального ААТ у субъекта повышен до по меньшей мере около 500 мкг/мл.

37. Способ по любому одному из пп. 1-35, отличающийся тем, что уровень функционального ААТ у субъекта повышен до по меньшей мере на около 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100% или более по сравнению с уровнем функционального ААТ у субъекта до введения.

38. Способ по п. 36 или п. 37, отличающийся тем, что уровень ААТ измеряют в сыворотке, плазме, крови, цереброспинальной жидкости и/или мокроте.

39. Способ по любому одному из пп. 1-38, отличающийся тем, что клетка или популяция клеток экспрессирует функциональный ААТ на уровне, который повешен по меньшей мере на около 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100% или более по сравнению с уровнем до введения.

40. Способ по любому одному из пп. 1-39, отличающийся тем, что клетка или популяция клеток способна экспрессировать ААТ.

41. Способ по п. 40, отличающийся тем, что клетка или популяция клеток, способная экспрессировать ААТ, происходит из ткани любого одного или более органа из печени, легкого, органа желудочно-кишечного тракта, почки, желудка, проксимального и

дистального участка тонкого кишечника, поджелудочной железы, надпочечников или головного мозга.

42. Способ по любому одному из пп. 4, 5, 8-37 или 41, отличающийся тем, что клетка или популяция клеток включает клетку печени (например, гепатоцит) или клетку легкого.

43. Способ по п. 42, отличающийся тем, что клетка печени представляет собой гепатоцит.

44. Способ по любому одному из пп. 1-43, отличающийся тем, что происходит снижение накопления ААТ в печени.

45. Способ по любому одному из пп. 1-44, отличающийся тем, что конструкция нуклеиновой кислоты содержит последовательность, которая кодирует белок ААТ дикого типа или его функциональный фрагмент.

46. Способ экспрессии ААТ у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту двунаправленной конструкции нуклеиновой кислоты, содержащей кодирующую последовательность гетерологичного белка ААТ, обеспечивая, таким образом, экспрессию ААТ у субъекта.

47. Способ лечения дефицита альфа-1-антитрипсина (ААТД) у субъекта, нуждающегося в белке ААТ, включающий введение двунаправленной конструкции нуклеиновой кислоты, содержащей кодирующую последовательность гетерологичного белка ААТ, осуществляя, таким образом, лечение ААТД у субъекта.

48. Способ экспрессии ААТ в клетке или популяции клеток, включающий введение в клетку или популяцию клеток двунаправленной конструкции нуклеиновой кислоты, содержащей кодирующую последовательность гетерологичного белка ААТ, обеспечивая, таким образом, экспрессию ААТ в клетке или популяции клеток.

49. Способ повышения секреции ААТ из клетки или популяции клеток печени, включающий введение в клетку или популяцию клеток двунаправленной конструкции нуклеиновой кислоты, содержащей кодирующую последовательность гетерологичного белка ААТ, обеспечивая, таким образом, повышение секреции ААТ из клетки или популяции клеток печени

50. Способ по любому одному из пп. 46-49, отличающийся тем, что двунаправленная конструкция нуклеиновой кислоты содержит

а) первый сегмент, содержащий кодирующую последовательность гетерологичного ААТ; и

б) второй сегмент, содержащий обратную комплементарную последовательность кодирующей последовательности гетерологичного ААТ,

причем конструкция не содержит промотор, который управляет экспрессией гетерологичного ААТ.

51. Способ по любому одному из пп. 46-49, отличающийся тем, что двунаправленная конструкция нуклеиновой кислоты содержит

а) первый сегмент, содержащий кодирующую последовательность гетерологичного

ААТ; и

b) второй сегмент, содержащий обратную комплементарную последовательность кодирующей последовательности второго полипептида,

причем конструкция не содержит промотор, который управляет экспрессией гетерологичного ААТ и/или второго полипептида.

52. Способ по любому одному из пп. 46-51, дополнительно включающий введение РНК-направляемого ДНК-связывающего агента.

53. Способ по любому одному из пп. 46-52, дополнительно включающий введение гРНК альбумина.

54. Способ по любому одному из пп. 46-53, отличающийся тем, что способ дополнительно включает индукцию двухцепочечного разрыва (ДЦР) в эндогенном гене SERPINA1.

55. Способ по любому одному из пп. 46-54, отличающийся тем, что способ дополнительно включает модификацию эндогенного гена SERPINA1.

56. Способ по любому одному из пп. 46-55, отличающийся тем, что способ дополнительно включает введение гидовой РНК SERPINA1, которая является по меньшей мере частично комплементарной целевой последовательности, представленной в экзоне 2, 3, 4 или 5 эндогенного гена SERPINA1 человека.

57. Способ по п. 56, отличающийся тем, что гидовая РНК SERPINA1 содержит направляющую последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1000-1128, или направляющую последовательность, которая по меньшей мере на 95%, 90%, 85%, 80% или 75% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 1000-1128.

58. Способ по любому одному из пп. 54-57, отличающийся тем, что способ дополнительно включает введение РНК-направляемого ДНК-связывающего агента.

59. Способ по любому одному из пп. 54-58, отличающийся тем, что негомологичное соединение концов (НГСК) приводит к мутации во время репарации ДЦР в эндогенном гене SERPINA1.

60. Способ по п. 59, отличающийся тем, что НГСК приводит к удалению или вставке нуклеотида(ов) во время репарации ДЦР в эндогенном гене SERPINA1.

61. Способ по п. 60, отличающийся тем, что удаление или вставка нуклеотида(ов) индуцирует сдвиг рамки или нонсенс-мутацию в эндогенном гене SERPINA1.

62. Способ по любому одному из пп. 46-61, отличающийся тем, что введение осуществляют *in vitro*.

63. Способ по любому одному из пп. 46-61, отличающийся тем, что введение осуществляют *in vivo*.

64. Способ по любому одному из пп. 46-63, отличающийся тем, что гРНК альбумина содержит направляющую последовательность, содержащую последовательность, выбранную из

a) последовательности, которая по меньшей мере на 95%, 90%, 85%, 80% или 75% идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 8, 13,

19, 28, 29, 31, 32, 33;

б) по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 8, 13, 19, 28, 29, 31, 32, 33;

с) последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 34, 40, 45, 51, 60, 61, 63, 64, 65, 66, 72, 77, 83, 92, 93, 95, 96 и 97.

65. Способ по любому одному из пп. 46-64, отличающийся тем, что двунаправленную конструкцию вводят в векторе нуклеиновой кислоты и/или липидной наночастице.

66. Способ по любому одному из пп. 46-65, отличающийся тем, что РНК-направляемый ДНК-связывающий агент и/или гРНК альбумина вводят в векторе нуклеиновой кислоты и/или липидной наночастице.

67. Способ по любому одному из пп. 46-66, отличающийся тем, что РНК-направляемый ДНК-связывающий агент и/или гРНК SERPINA1 вводят в векторе нуклеиновой кислоты и/или липидной наночастице.

68. Способ по любому одному из пп. 46-67, отличающийся тем, что вектор нуклеиновой кислоты представляет собой вирусный вектор.

69. Способ по п. 68, отличающийся тем, что вирусный вектор выбран из группы, состоящей из аденоассоциированного вирусного (AAV) вектора, аденовирусного вектора, ретровирусного вектора и лентивирусного вектора.

70. Способ по п. 69, отличающийся тем, что AAV-вектор выбран из группы, состоящей из AAV1, AAV2, AAV3, AAV3B, AAV4, AAV5, AAV6, AAV6.2, AAV7, AAVrh.64R1, AAVhu.37, AAVrh.8, AAVrh.32.33, AAV8, AAV9, AAV-DJ, AAV2/8, AAVrh10, AAVLK03, AV10, AAV11, AAV12, rh10 и их гибридов.

71. Способ по любому одному из пп. 46-70, отличающийся тем, что двунаправленную конструкцию, РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, гРНК альбумина и гРНК SERPINA1 вводят последовательно, в любом порядке и/или в любой комбинации.

72. Способ по любому одному из пп. 46-70, отличающийся тем, что двунаправленную конструкцию, РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, гРНК альбумина и гРНК SERPINA1, отдельно или в любой комбинации, вводят одновременно.

73. Способ по любому одному из пп. 46-70, отличающийся тем, что РНК-направляемый ДНК-связывающий агент или РНК-направляемый ДНК-связывающий агент и гРНК альбумина в комбинации вводят до введения конструкции нуклеиновой кислоты.

74. Способ по любому одному из пп. 46-70, отличающийся тем, что двунаправленную конструкцию вводят до введения гРНК альбумина и/или РНК-направляемого ДНК-связывающего агента.

75. Способ по любому одному из пп. 46-74, отличающийся тем, что РНК-направляемый ДНК-связывающий агент представляет собой Cas-нуклеазу класса 2.

76. Способ по п. 75, отличающийся тем, что Cas-нуклеаза представляет собой Cas9.

77. Способ по п. 76, отличающийся тем, что Cas-нуклеаза представляет собой Cas9-

нуклеазу *S. pyogenes*.

78. Способ по любому одному из пп. 75-77, отличающийся тем, что Cas-нуклеаза представляет собой кливазу (cleavase).

79. Способ по любому одному из пп. 75-77, отличающийся тем, что Cas-нуклеаза представляет собой никазу.

80. Способ по любому одному из пп. 46-79, отличающийся тем, что двунаправленная конструкция представляет собой одноцепочечную ДНК.

81. Способ по любому одному из пп. 46-80, отличающийся тем, что двунаправленная конструкция представляет собой двухцепочечную ДНК.

82. Способ по любому одному из пп. 46, 47 или 50-81, отличающийся тем, что уровень функционального ААТ у субъекта повышен до по меньшей мере около 500 мкг/мл.

83. Способ по любому одному из пп. 46, 47 или 50-81, отличающийся тем, что уровень функционального ААТ у субъекта повышен до по меньшей мере на около 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100% или более по сравнению с уровнем функционального ААТ у субъекта до введения.

84. Способ по п. 82 или п. 83, отличающийся тем, что уровень ААТ измеряют в сыворотке, плазме, крови, цереброспинальной жидкости и/или мокроте.

85. Способ по любому одному из пп. 48-81, отличающийся тем, что клетка или популяция клеток экспрессирует функциональный ААТ на уровне, который повешен по меньшей мере на около 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100% или более по сравнению с уровнем до введения.

86. Способ по любому одному из пп. 48-81 или п. 85, отличающийся тем, что клетка или популяция клеток включает клетку печени.

87. Способ по любому одному из пп. 46-86, отличающийся тем, что происходит снижение накопления ААТ в печени.

88. Способ по любому одному из пп. 46-87, отличающийся тем, что конструкция нуклеиновой кислоты содержит последовательность, которая кодирует белок ААТ дикого типа или его функциональный фрагмент.

89. Способ лечения дефицита альфа-1-антитрипсина (ААТД) у субъекта, нуждающегося в белке ААТ, включающий введение:

i) системы редактирования генов, способной снижать эндогенную экспрессию *SERPINA1*;

ii) конструкции нуклеиновой кислоты, содержащей кодирующую последовательность гетерологичного белка ААТ;

iii) РНК-направляемого ДНК-связывающего агента; и

iv) гидовой РНК (гРНК) альбумина, содержащей последовательность, выбранную из:

а) последовательности, которая по меньшей мере на 95%, 90%, 85%, 80% или 75% идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 8, 13,

19, 28, 29, 31, 32 и 33;

b) по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 8, 13, 19, 28, 29, 31, 32 и 33;

c) последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 34, 40, 45, 51, 60, 61, 63, 64, 65, 66, 72, 77, 83, 92, 93, 95, 96 и 97;

d) последовательности, которая по меньшей мере на 95%, 90%, 85%, 80% или 75% идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2-33;

e) по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2-33;

f) последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 34-97; и

g) последовательности, комплементарной 15 последовательным нуклеотидам +/- 10 нуклеотидам геномных координат, приведенных для SEQ ID NO: 2-33,

осуществляя, таким образом, лечение AATD у субъекта.

90. Способ по п. 88, отличающийся тем, что система редактирования генов содержит гидовую РНК SERPINA1, содержащую направляющую последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1000-1128, или направляющую последовательность, которая по меньшей мере на 95%, 90%, 85%, 80% или 75% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 1000-1128.

91. Двухнаправленная конструкция нуклеиновой кислоты, содержащая

a) первый сегмент, содержащий кодирующую последовательность полипептида AAT; и

b) второй сегмент, содержащий обратную комплементарную последовательность кодирующей последовательности полипептида AAT,

причем конструкция не содержит промотор, который управляет экспрессией полипептида AAT.

92. Двухнаправленная конструкция нуклеиновой кислоты по п. 91, отличающаяся тем, что второй сегмент расположен 3' относительно первого сегмента.

93. Двухнаправленная конструкция нуклеиновой кислоты по любому одному из пп. 91-92, отличающаяся тем, что кодирующая последовательность обратной комплементарной последовательности во втором сегменте имеет частоту использования кодонов, отличную от кодирующей последовательности первого сегмента, с целью снижения вероятности образования шпильки.

94. Двухнаправленная конструкция, отличающаяся тем, что обратная комплементарная последовательность является:

a. не в значительной степени комплементарной кодирующей последовательности первого сегмента;

b. не в значительной степени комплементарной фрагменту кодирующей последовательности первого сегмента;

c. высококомплементарной кодирующей последовательности первого сегмента;

d. высококомплементарной фрагменту кодирующей последовательности первого

сегмента;

e. по меньшей мере на 60% идентичной обратной комплементарной последовательности кодирующей последовательности первого сегмента;

f. по меньшей мере на 70% идентичной обратной комплементарной последовательности кодирующей последовательности первого сегмента;

f. по меньшей мере на 90% идентичной обратной комплементарной последовательности кодирующей последовательности первого сегмента;

g. на 50-80% идентичной обратной комплементарной последовательности кодирующей последовательности первого сегмента; и/или

h. на 60-100% идентичной обратной комплементарной последовательности кодирующей последовательности первого сегмента.

95. Двухнаправленная конструкция нуклеиновой кислоты по любому одному из пп. 91-93, отличающаяся тем, что второй сегмент содержит нуклеотидную последовательность, имеющую около 30%, около 35%, около 40%, около 45%, около 50%, около 55%, около 60%, около 65%, около 70%, около 75%, около 80%, около 85%, около 90%, около 95%, около 97% или около 99% комплементарности с кодирующей последовательностью в первом сегменте.

96. Двухнаправленная конструкция нуклеиновой кислоты по любому одному из пп. 91-94, отличающаяся тем, что кодирующая последовательность второго сегмента кодирует полипептид ААТ с использованием одного или более альтернативных кодонов для одной или более аминокислот, кодируемых кодирующей последовательностью в первом сегменте.

97. Двухнаправленная конструкция нуклеиновой кислоты по любому одному из пп. 91-96, отличающаяся тем, что последовательность второго сегмента представляет собой обратную комплементарную последовательность кодирующей последовательности первого сегмента.

98. Двухнаправленная конструкция нуклеиновой кислоты по любому одному из пп. 91-97, отличающаяся тем, что конструкция не содержит плечо гомологии.

99. Двухнаправленная конструкция нуклеиновой кислоты по любому одному из пп. 91-98, отличающаяся тем, что первый сегмент связан со вторым сегментом линкером.

100. Двухнаправленная конструкция нуклеиновой кислоты по п. 99, отличающаяся тем, что длина линкера составляет 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250, 300, 500, 1000, 1500, 2000 нуклеотидов.

101. Двухнаправленная конструкция нуклеиновой кислоты по любому одному из пп. 91-100, отличающаяся тем, что каждый из первого и второго сегментов содержит хвостовую последовательность полиаденилирования.

102. Двухнаправленная конструкция нуклеиновой кислоты по любому одному из пп. 91-101, отличающаяся тем, что конструкция содержит сайт акцептора сплайсинга.

103. Двухнаправленная конструкция нуклеиновой кислоты по п. 102, отличающаяся тем, что конструкция содержит первый сайт акцептора сплайсинга, расположенный выше

первого сегмента, и второй (обратный) сайт акцептора сплайсинга, расположенный ниже второго сегмента.

104. Двухнаправленная конструкция нуклеиновой кислоты по любому одному из пп. 1-103, отличающаяся тем, что конструкция является двухцепочечной, необязательно, двухцепочечной ДНК.

105. Двухнаправленная конструкция нуклеиновой кислоты по любому одному из пп. 1-104, отличающаяся тем, что конструкция является одноцепочечной, необязательно, одноцепочечной ДНК.

106. Двухнаправленная конструкция нуклеиновой кислоты по любому одному из пп. 1-105, отличающаяся тем, что последовательность, кодирующая полипептид ААТ, является кодон-оптимизированной.

107. Двухнаправленная конструкция нуклеиновой кислоты по любому одному из пп. 1-106, отличающаяся тем, что конструкция содержит одну или более из следующих концевых структур: шпильку, петли, инвертированные концевые повторы (ИКП) или тороид.

108. Двухнаправленная конструкция нуклеиновой кислоты по любому одному из пп. 1-107, отличающаяся тем, что конструкция содержит один, два или три инвертированных концевых повтора (ИКП).

109. Двухнаправленная конструкция нуклеиновой кислоты по любому одному из пп. 1-108, отличающаяся тем, что конструкция содержит не более двух ИКП.

110. Вектор, содержащий конструкцию по любому одному из пп. 91-109.

111. Вектор по п. 110, отличающийся тем, что вектор представляет собой вектор на основе аденоассоциированного вируса (AAV).

112. Вектор по п. 110, отличающийся тем, что AAV содержит одноцепочечный геном (ssAAV) или самокомплементарный геном (scAAV).

113. Вектор по п. 112, отличающийся тем, что AAV-вектор выбран из группы, состоящей из AAV1, AAV2, AAV3, AAV3B, AAV4, AAV5, AAV6, AAV6.2, AAV7, AAVrh.64R1, AAVhu.37, AAVrh.8, AAVrh.32.33, AAV8, AAV9, AAV-DJ, AAV2/8, AAVrh10, AAVLK03, AV10, AAV11, AAV12, rh10 и их гибридов.

114. Вирусный вектор, содержащий самокомплементарную (или двухцепочечную) конструкцию нуклеиновой кислоты, которая содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид ААТ, при этом вектор не содержит промотор, управляющий экспрессией полипептида ААТ.

115. Вектор по п. 114, отличающийся тем, что вектор не содержит плечо гомологии.

116. Липидная наночастица, содержащая конструкцию по любому одному из пп. 91-109.

117. Клетка-хозяин, содержащая конструкцию по любому одному из пп. 91-109.

118. Клетка-хозяин, полученная способом по любому предшествующему пункту.

119. Клетка-хозяин по п. 117, отличающаяся тем, что клетка-хозяин представляет

собой клетку печени.

120. Клетка-хозяин по пп. 117-119, отличающаяся тем, что клетка-хозяин относится к типу неделящихся клеток.

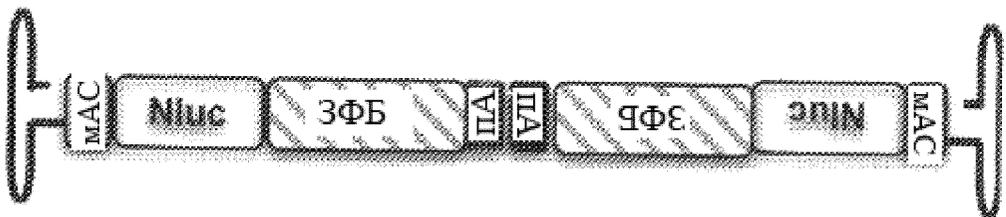
121. Клетка-хозяин по любому одному из пп. 117-120, отличающаяся тем, что клетка-хозяин экспрессирует полипептид ААТ, кодируемый двунаправленной конструкцией.

122. Клетка-хозяин по любому одному из пп. 117-121, отличающаяся тем, что клетка-хозяин представляет собой гепатоцит.

123. Способ, конструкция или клетка-хозяин по любому предшествующему пункту, отличающиеся тем, что гРНК содержит SEQ ID NO: 901.

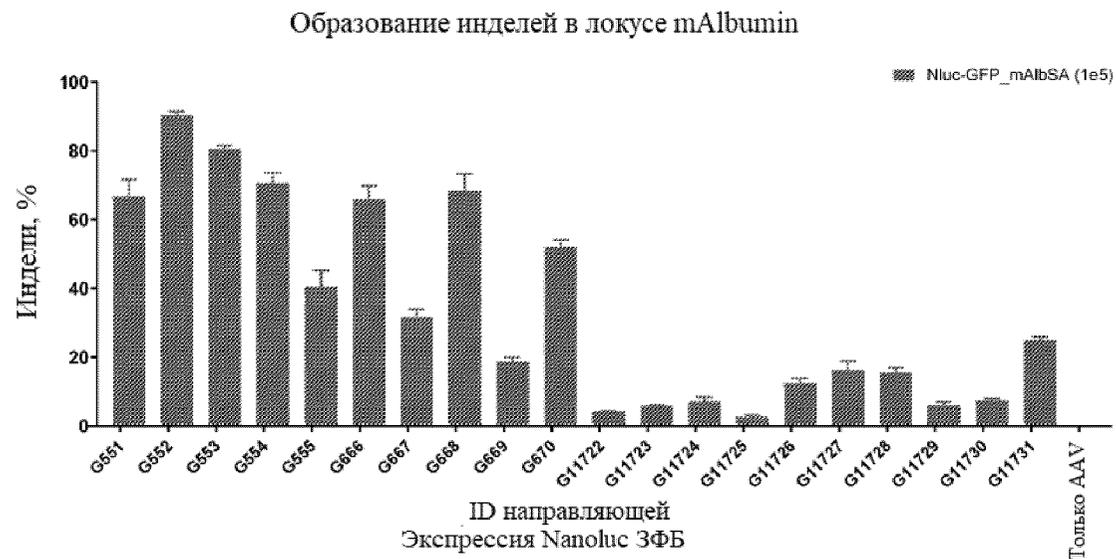
По доверенности

Р00415 – Вставочная матрица

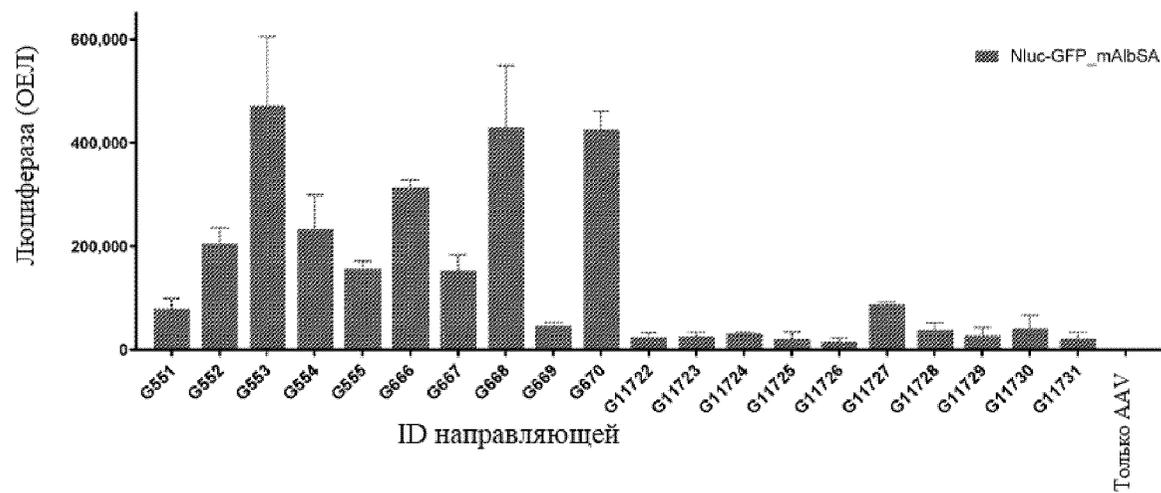


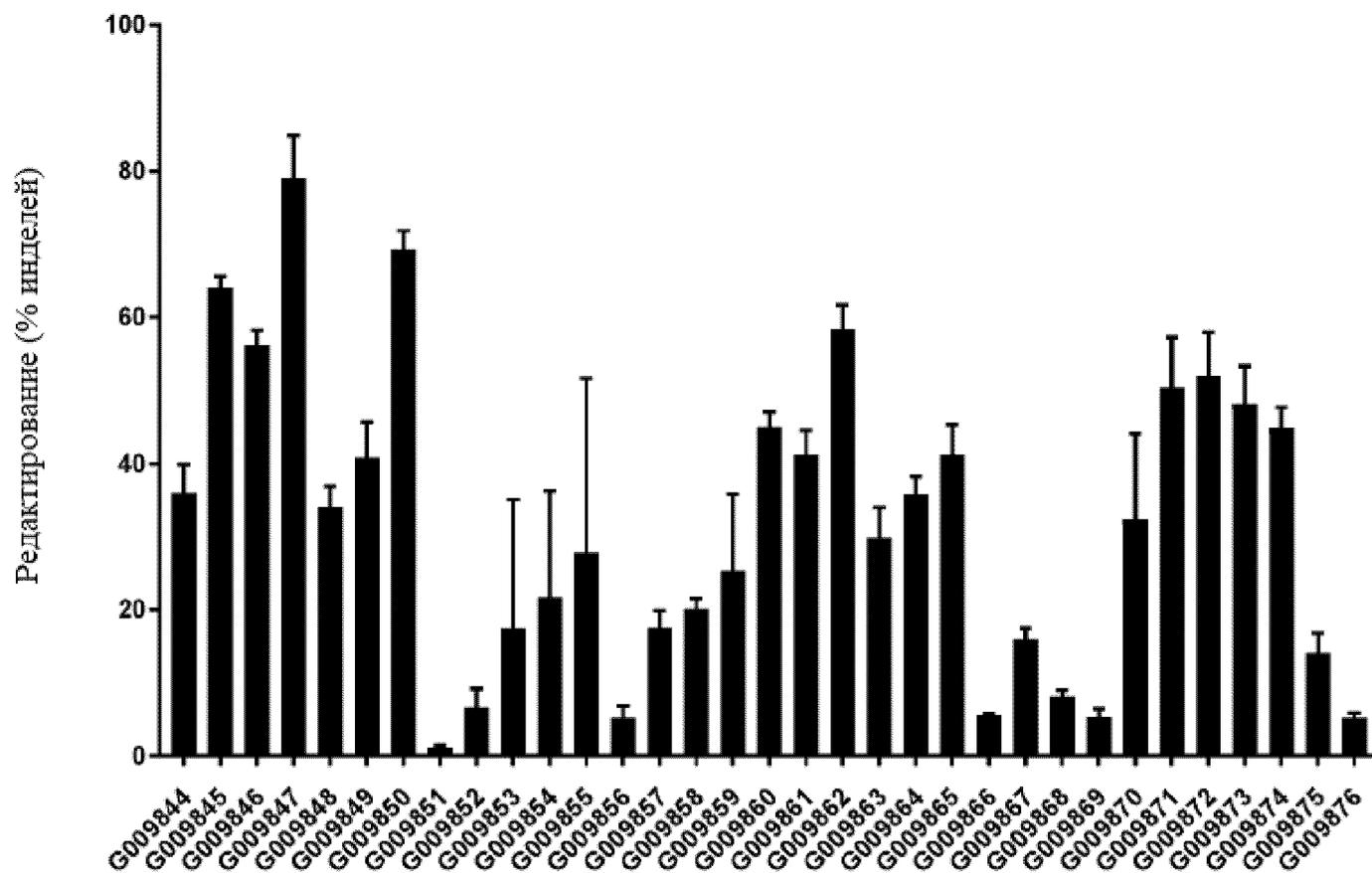
Фиг. 1А

Фиг. 1В

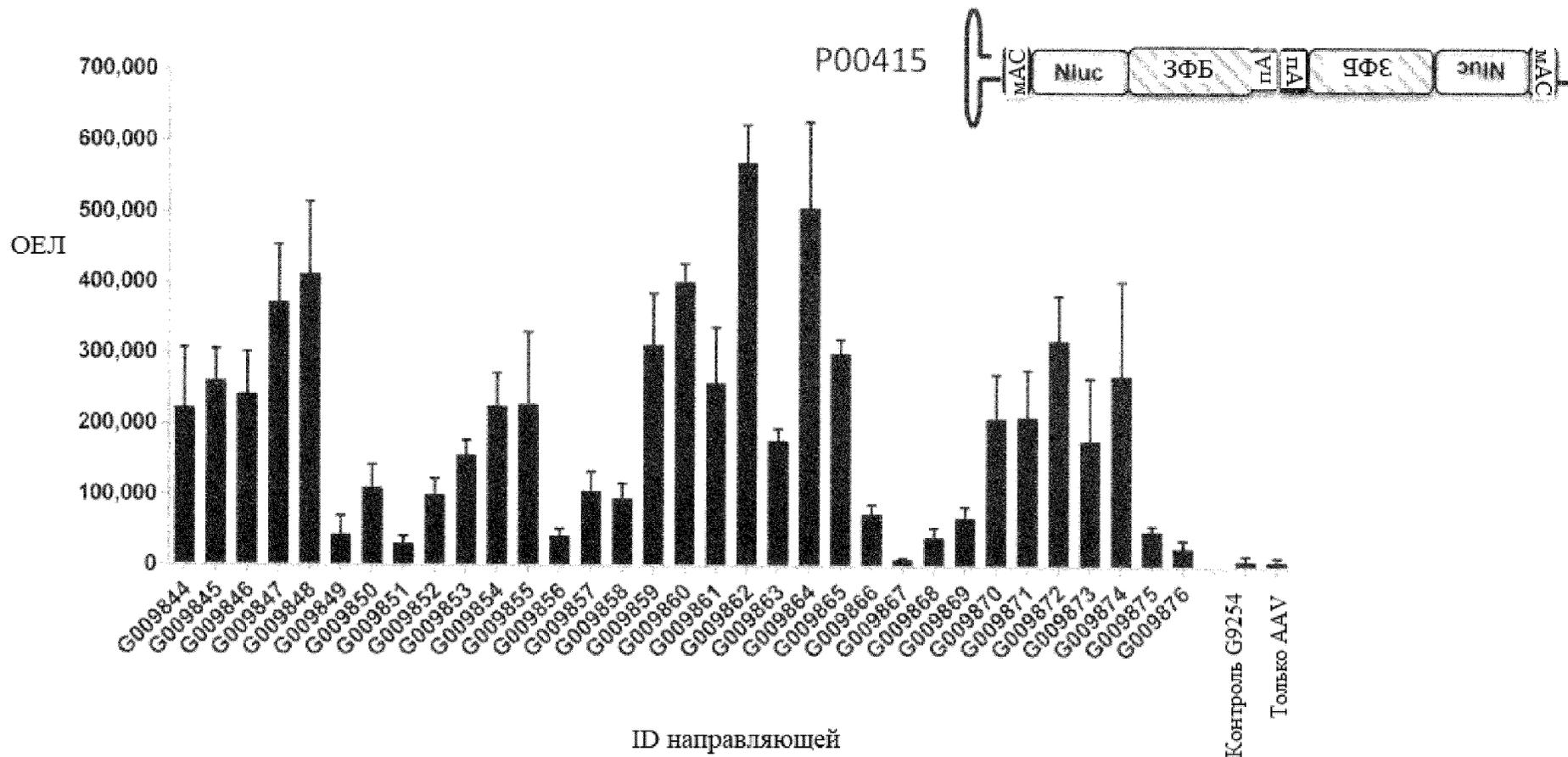


Фиг. 1С

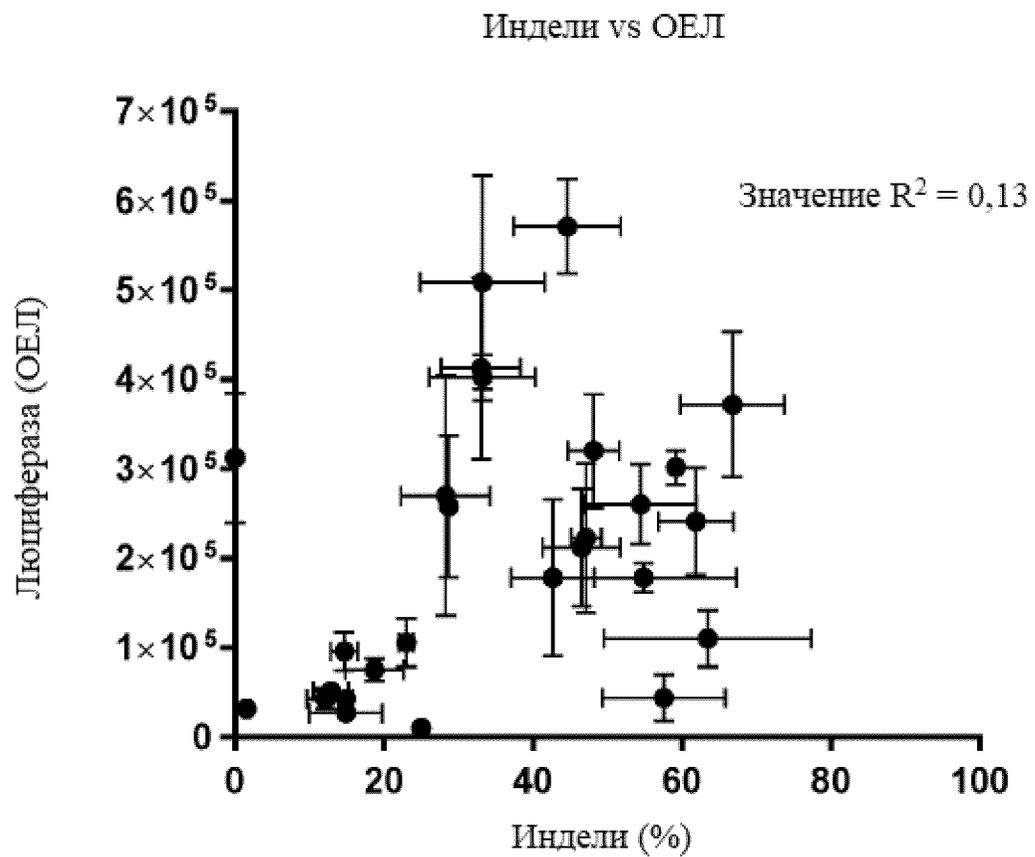




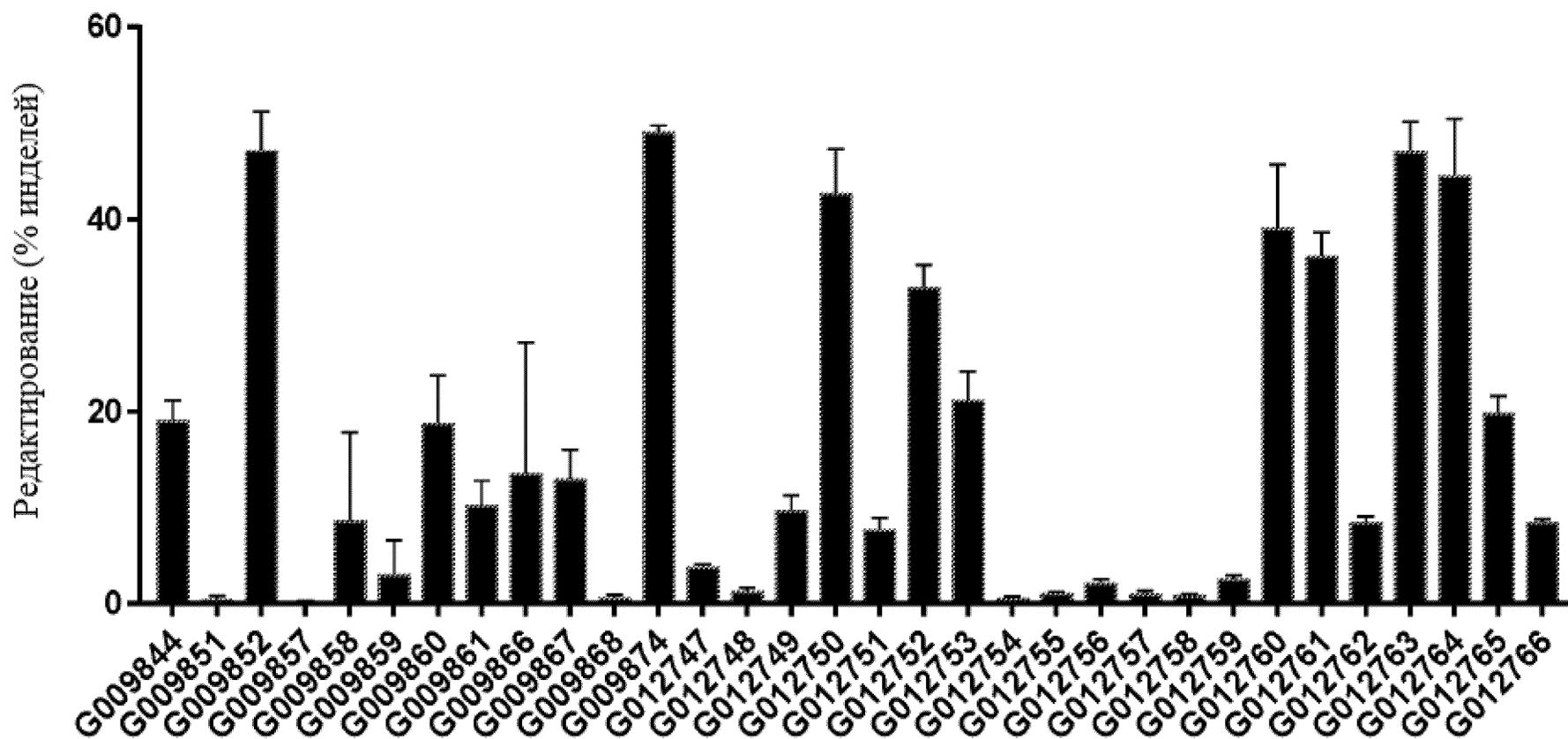
Фиг. 2А



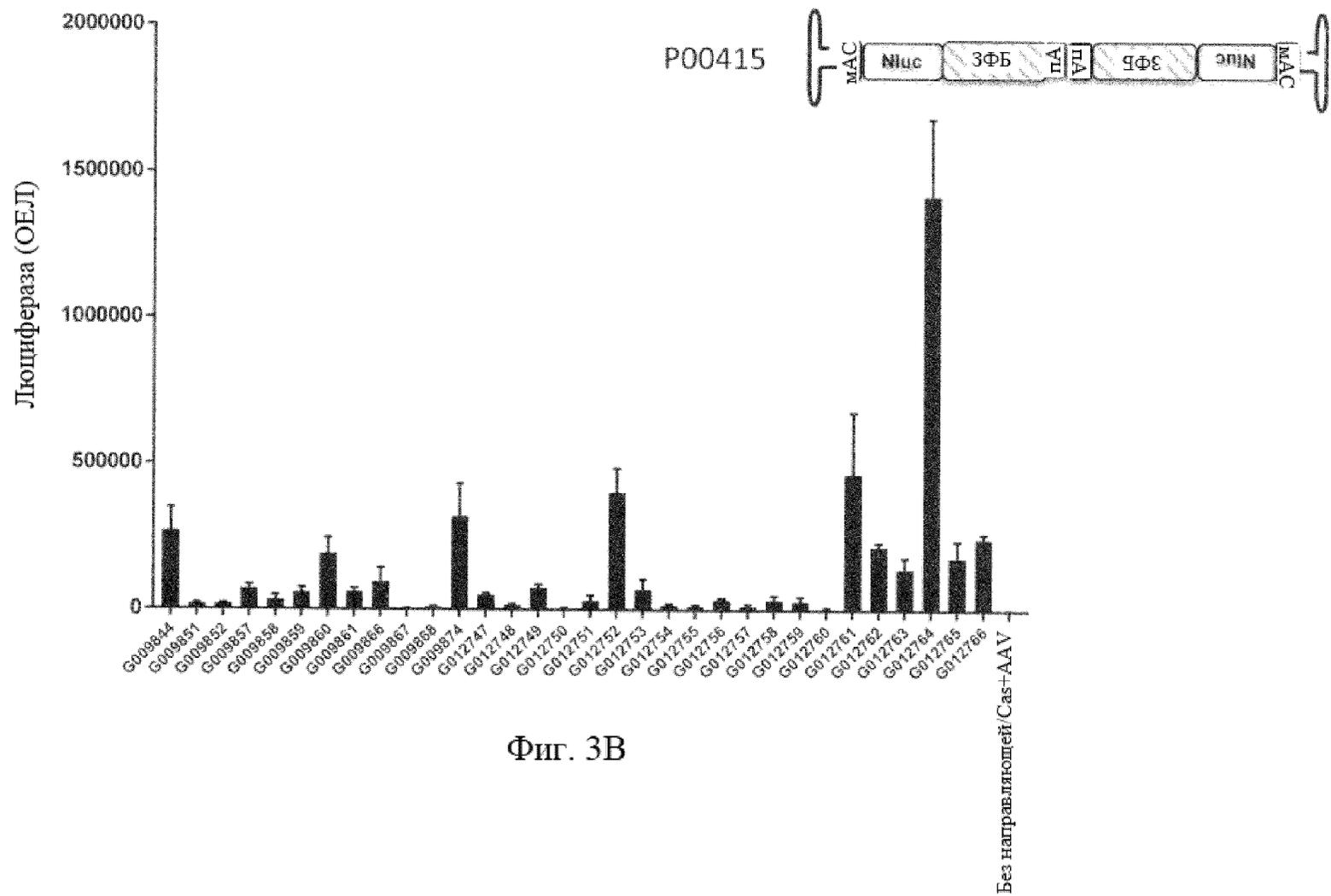
Фиг. 2В



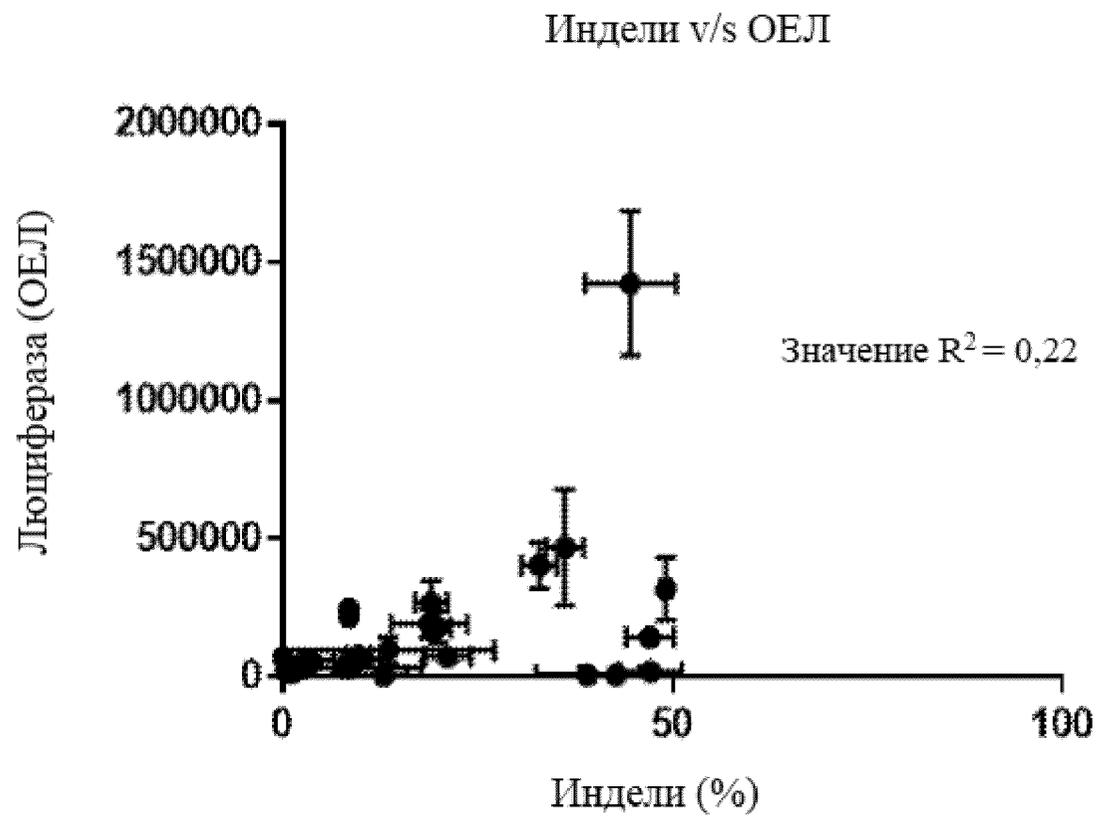
Фиг. 2С



Фиг. 3А

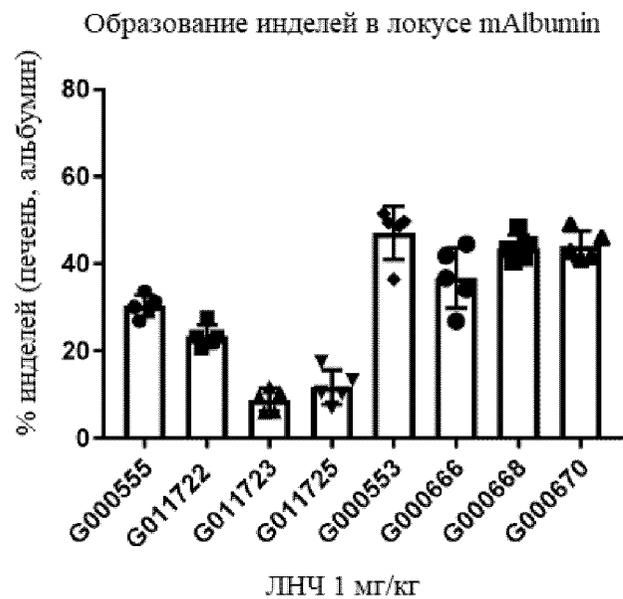


Фиг. 3В

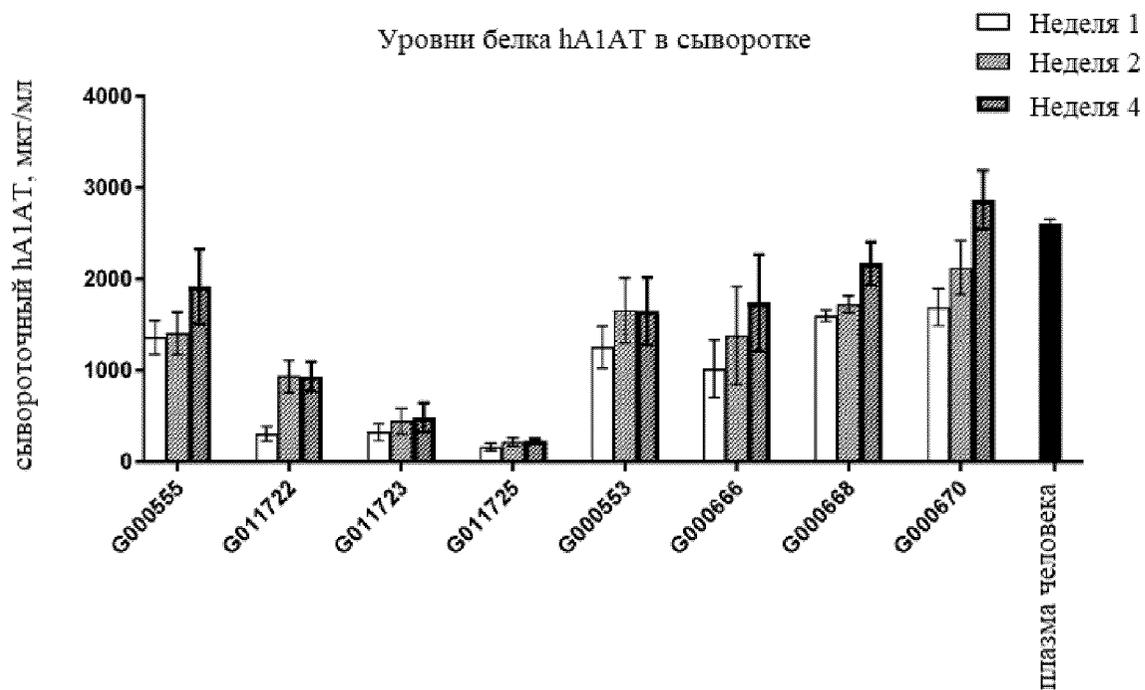


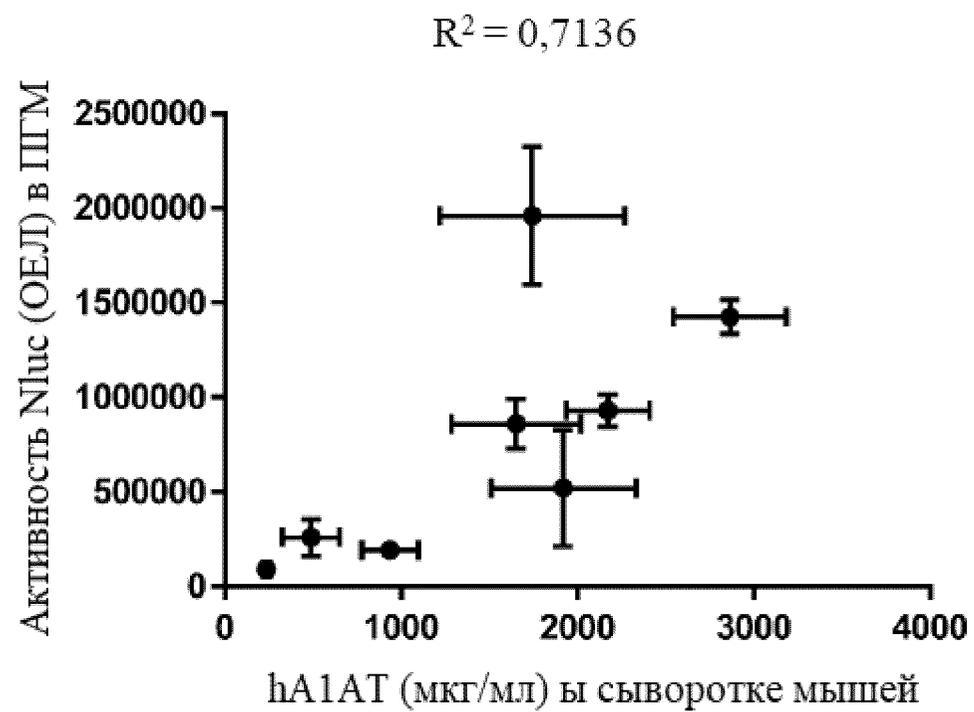
Фиг. 3С

Фиг. 4А



Фиг. 4В





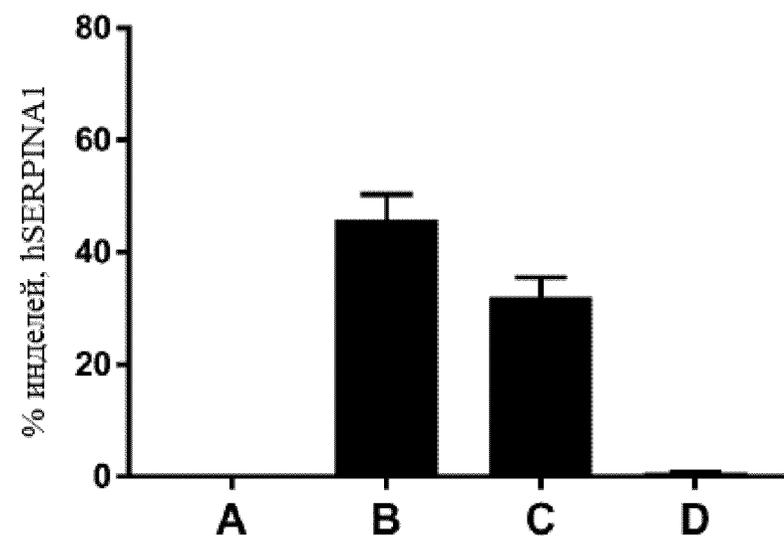
Фиг. 4С

Фиг. 5А

Группа обработки	Фон	Стадия 1	Стадия 2
A	NGS-PiZ	Носитель	Носитель
B	NGS-PiZ	G000409	G000668 Только
C	NGS-PiZ	G000409	G000668 + P00450
D	C57Bl/6	Носитель	G000668 + P00450

Фиг. 5В

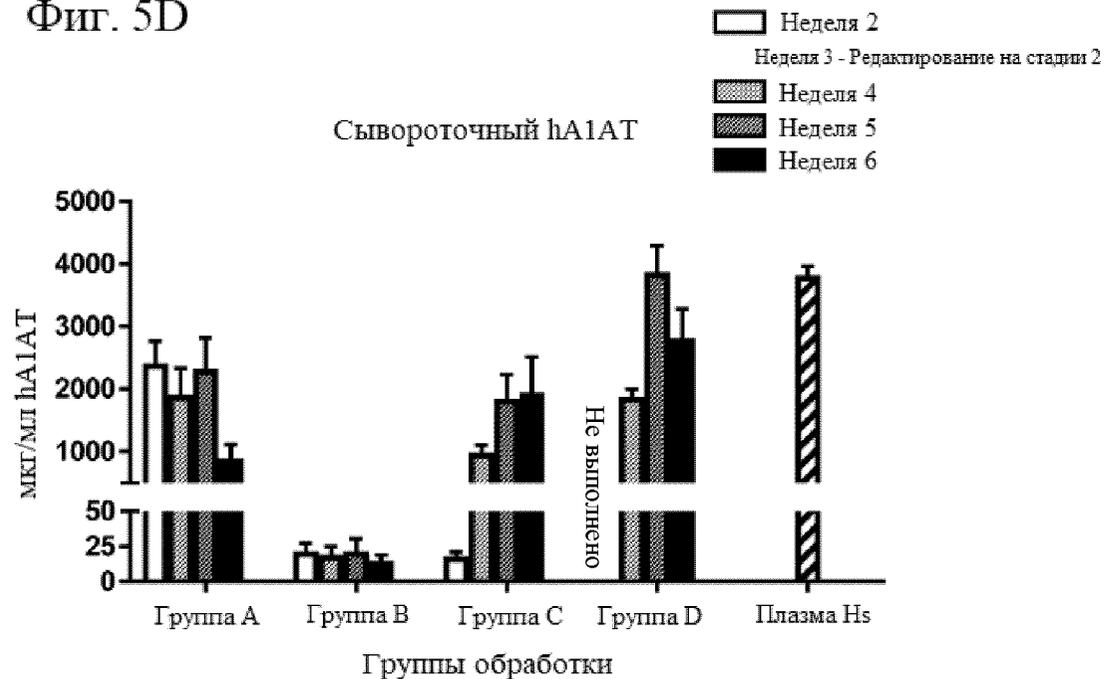
Редактирование на стадии 1 – *hSERPINA1*

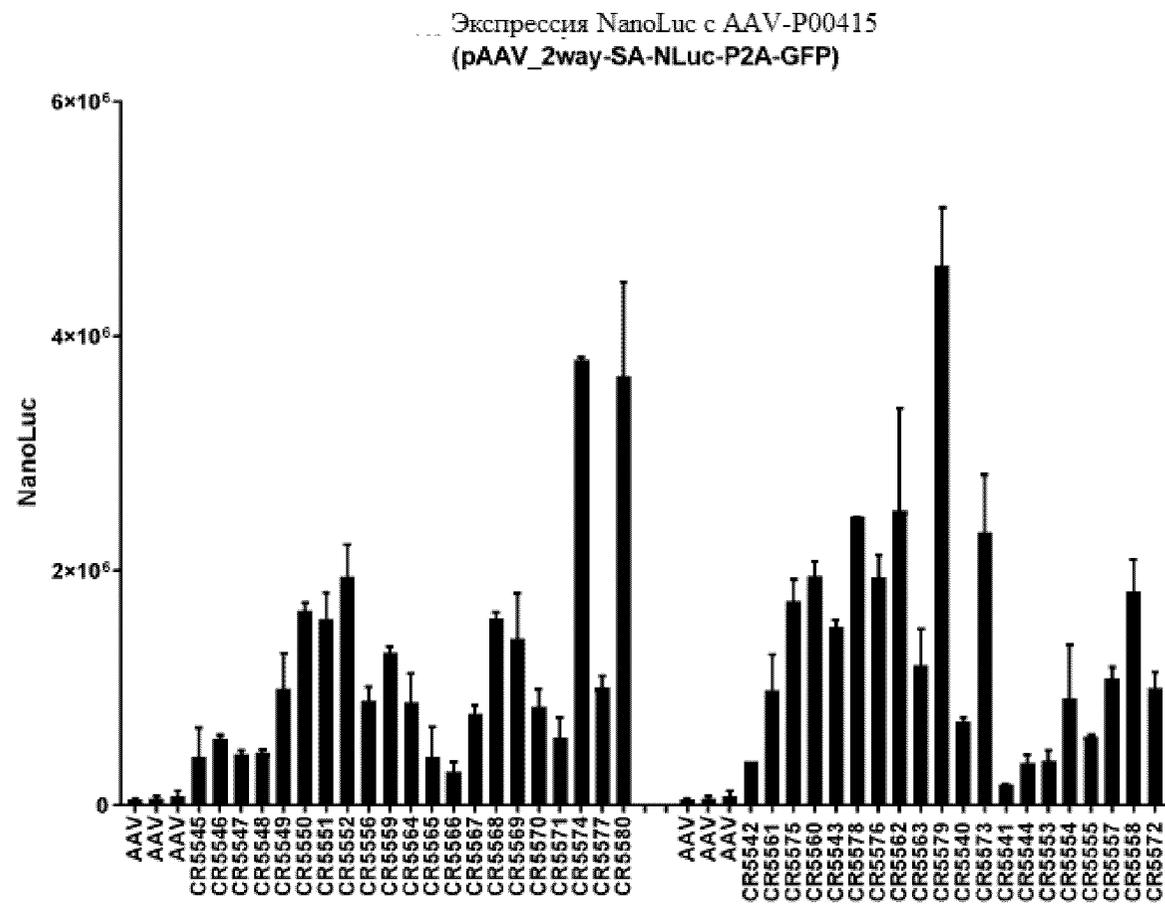


Фиг. 5С

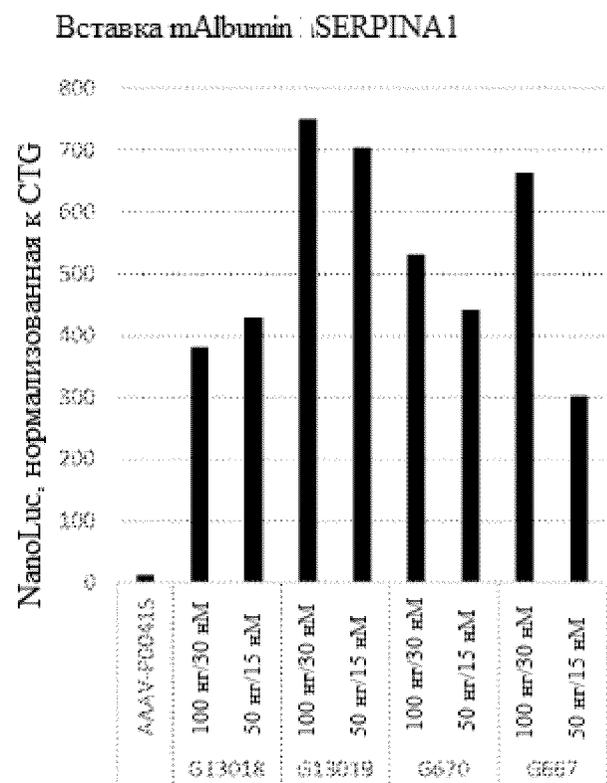


Фиг. 5D





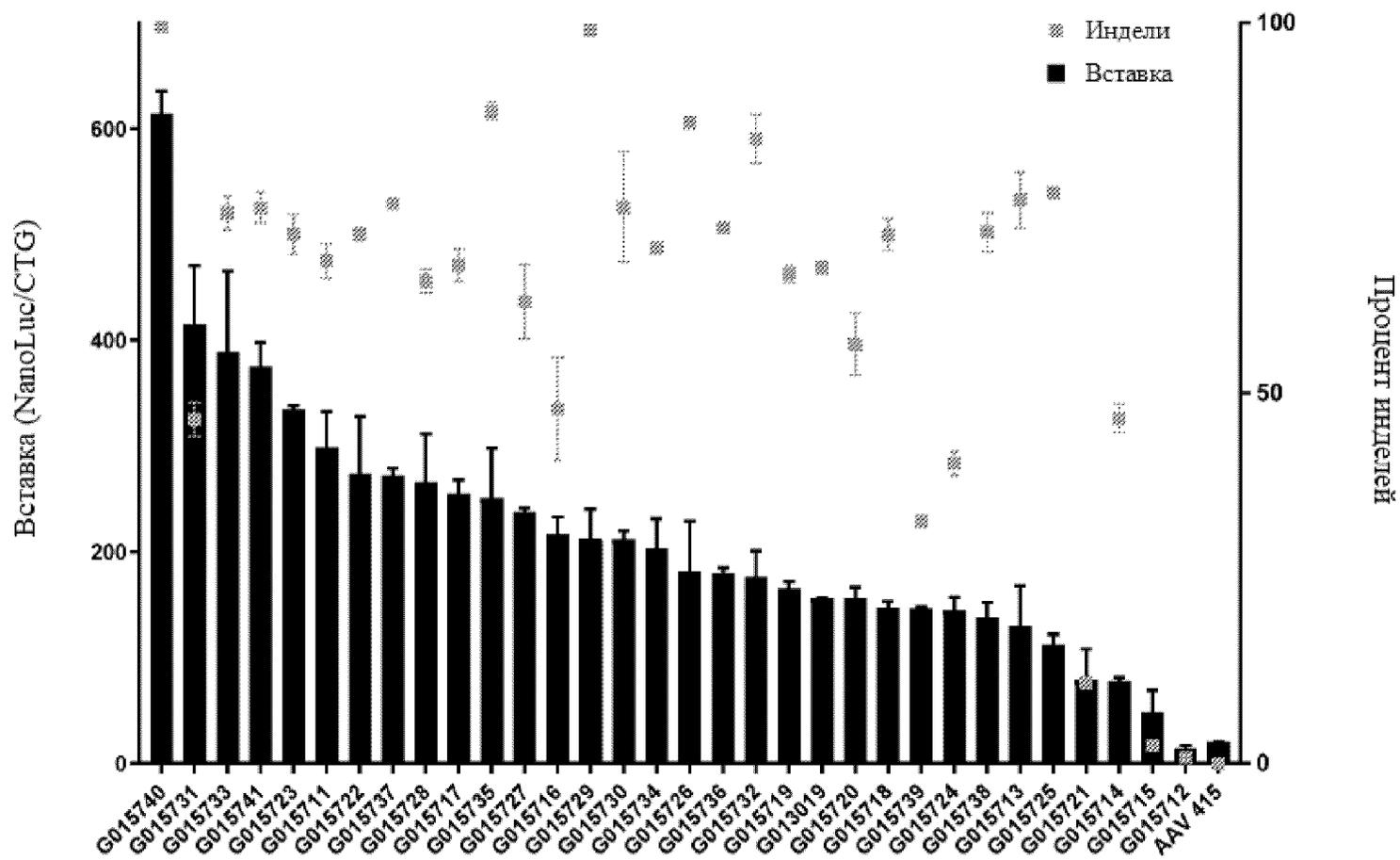
Фиг. 6



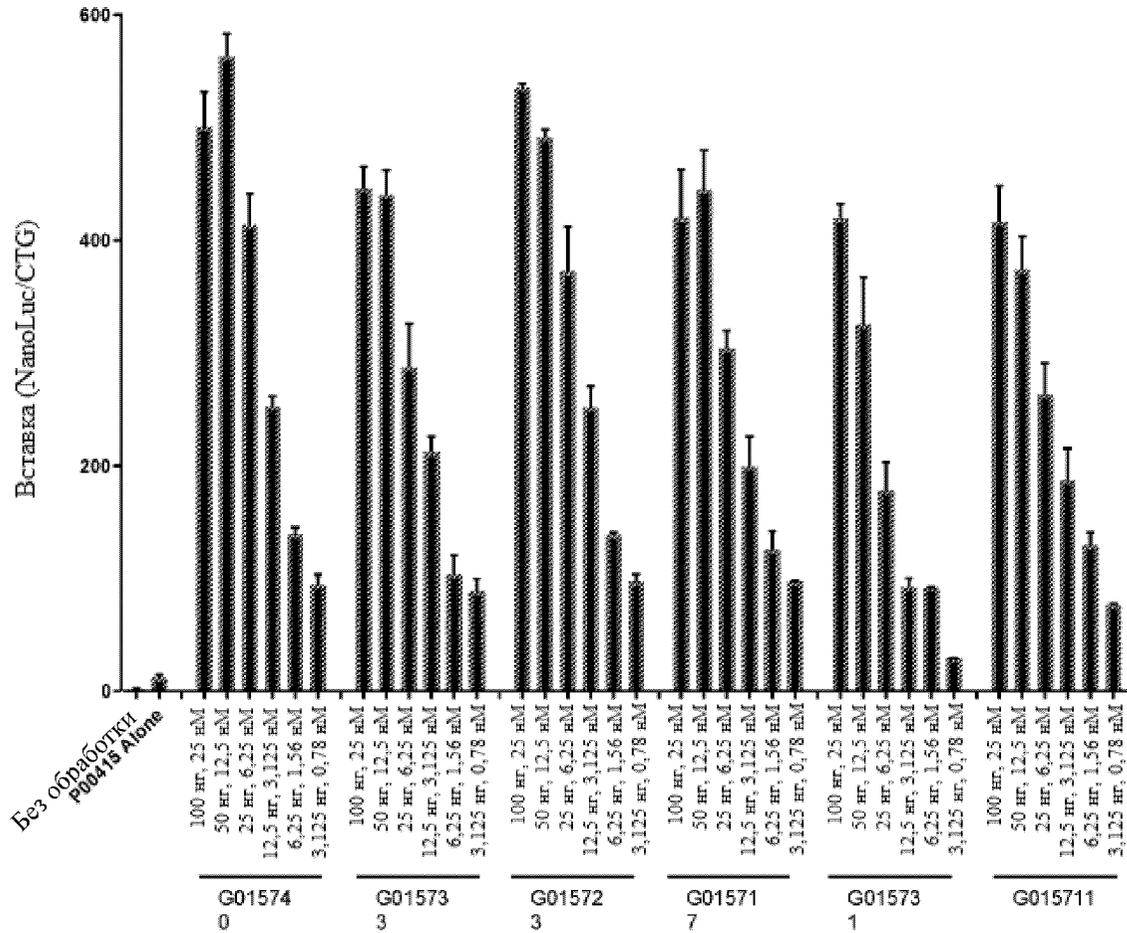
Фиг. 7

Фиг. 8

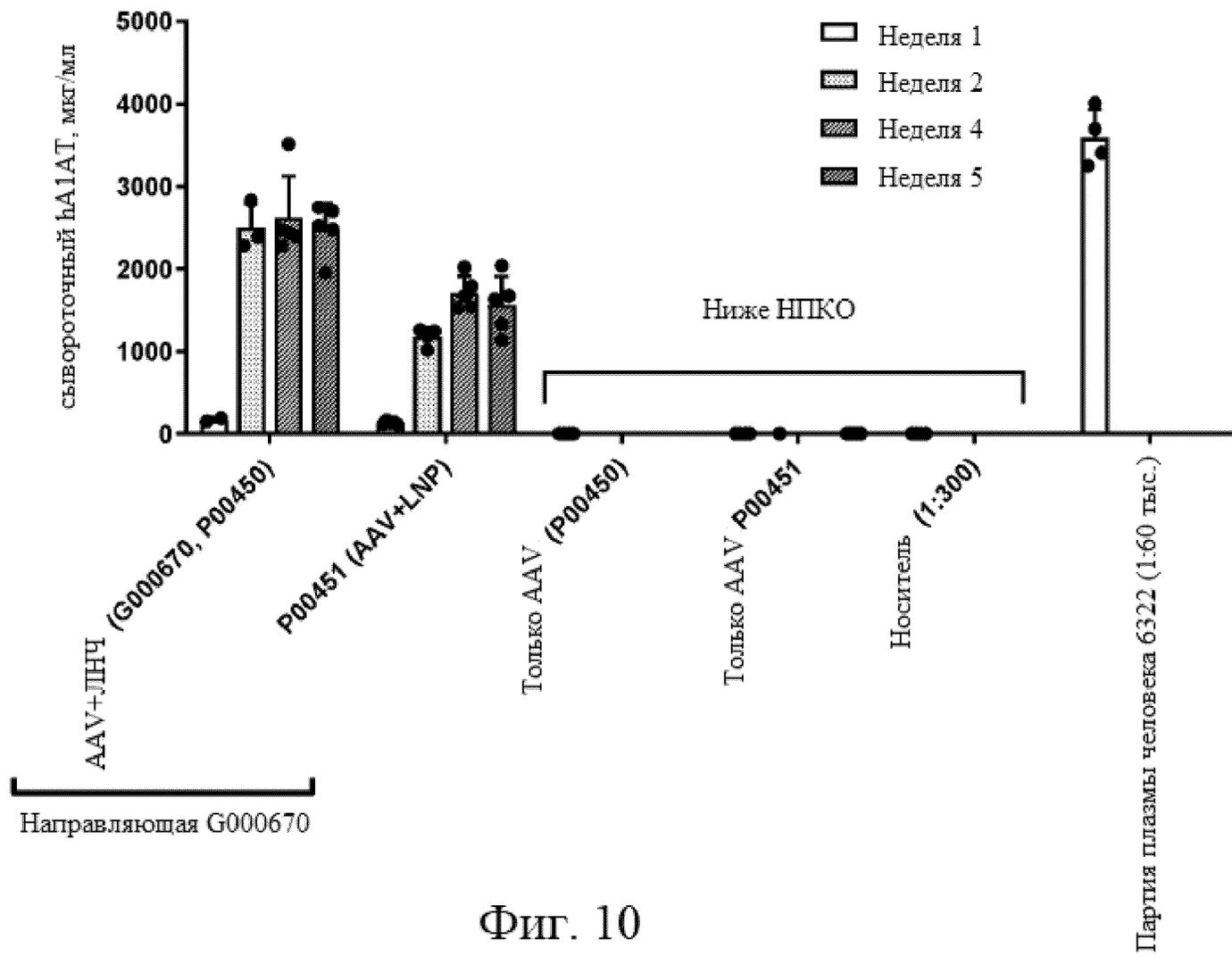
Вставка в локус альбумина крысы vs. индели
AAV-415



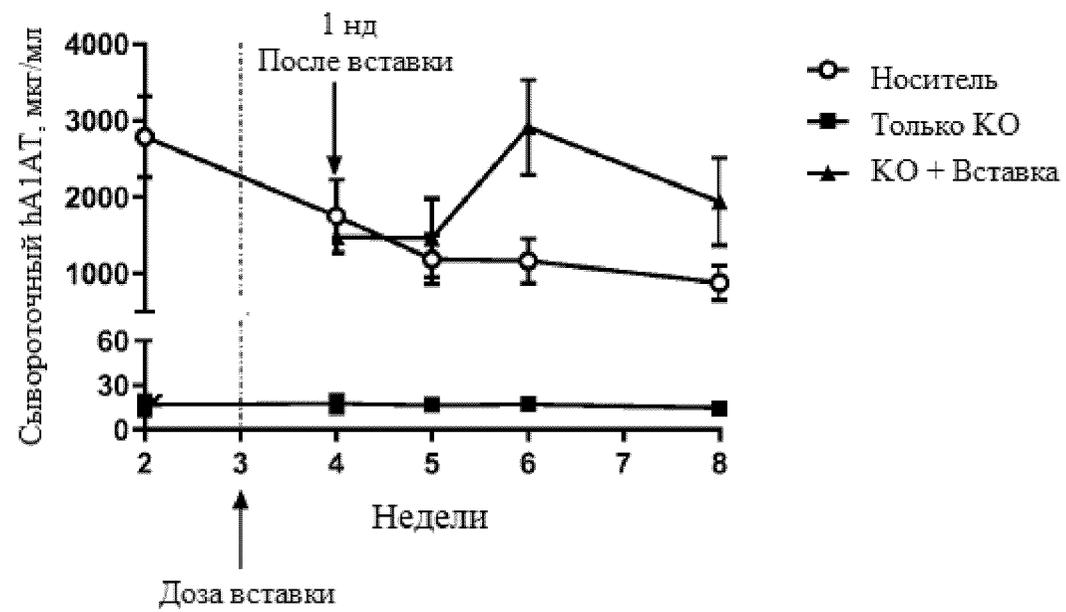
Лучшие направляющие DRC альбумина крыс
AAV-415



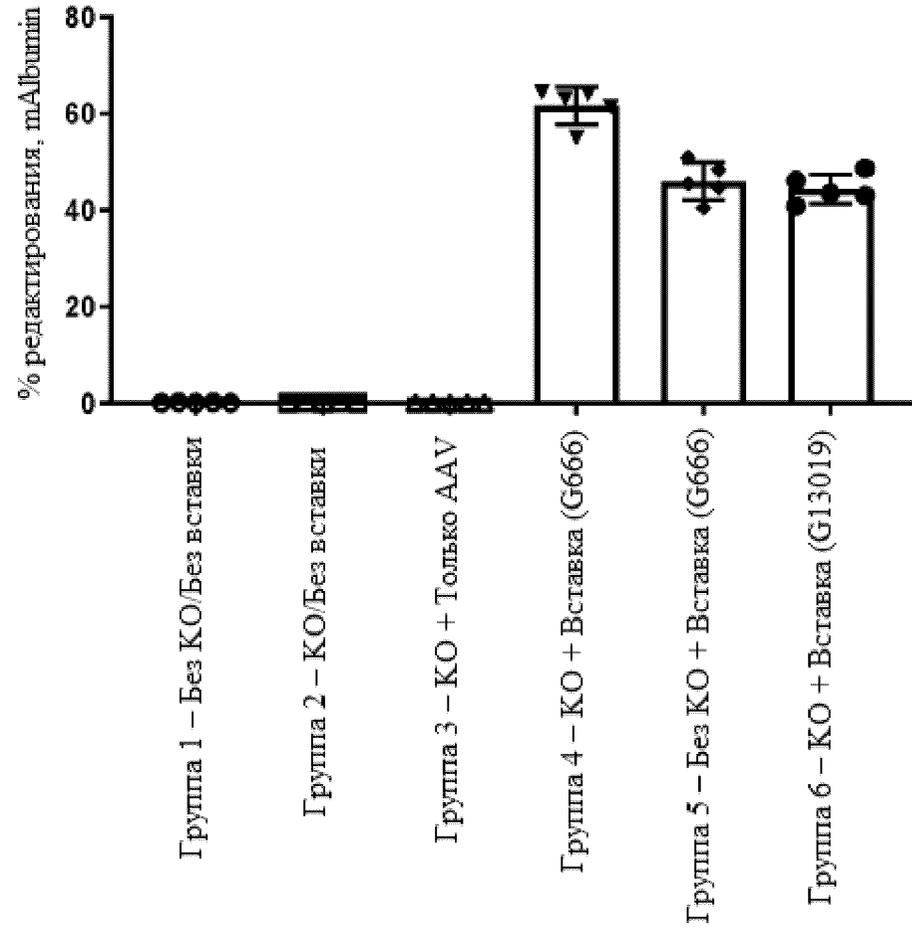
Фиг. 9



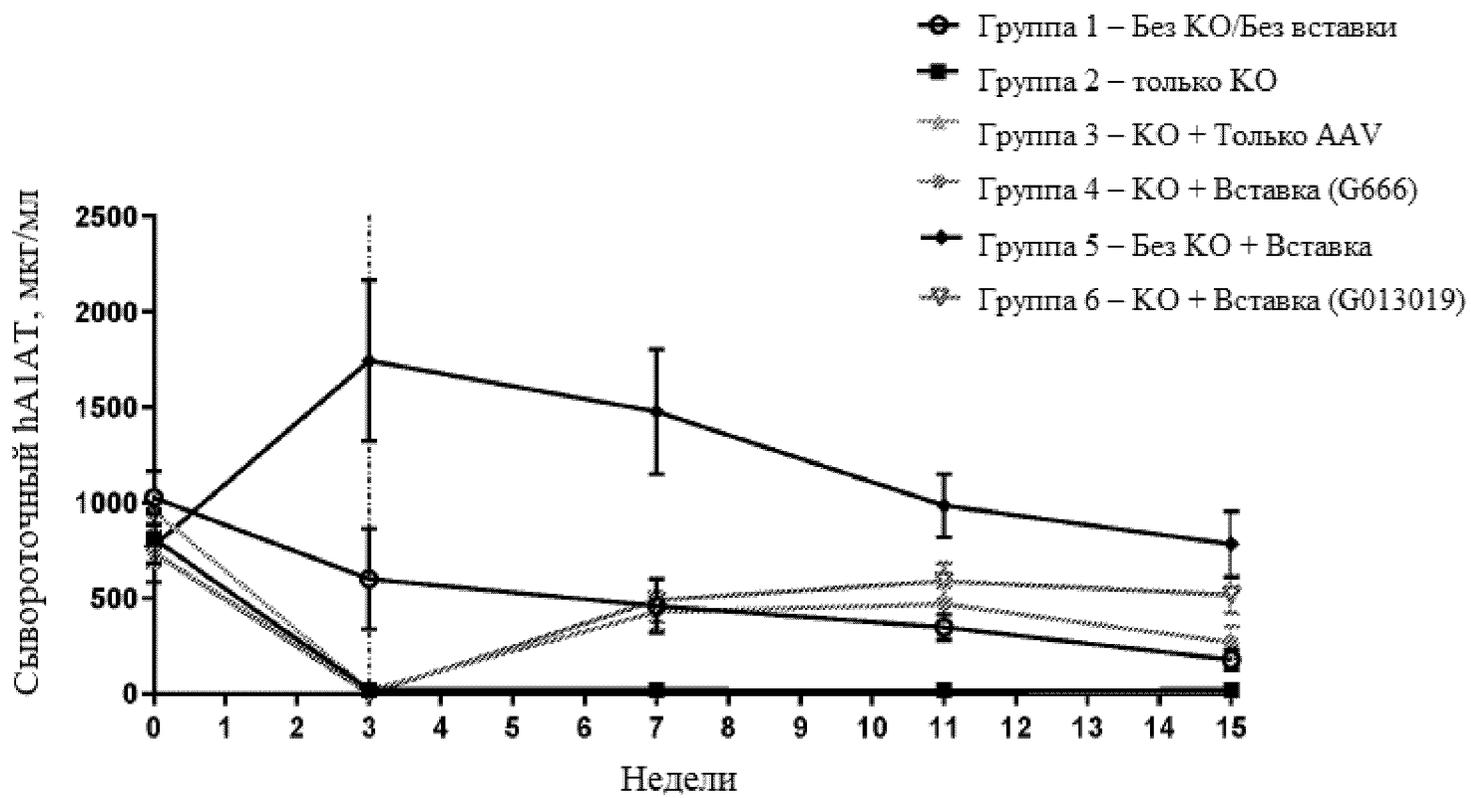
Фиг. 10



Фиг. 11

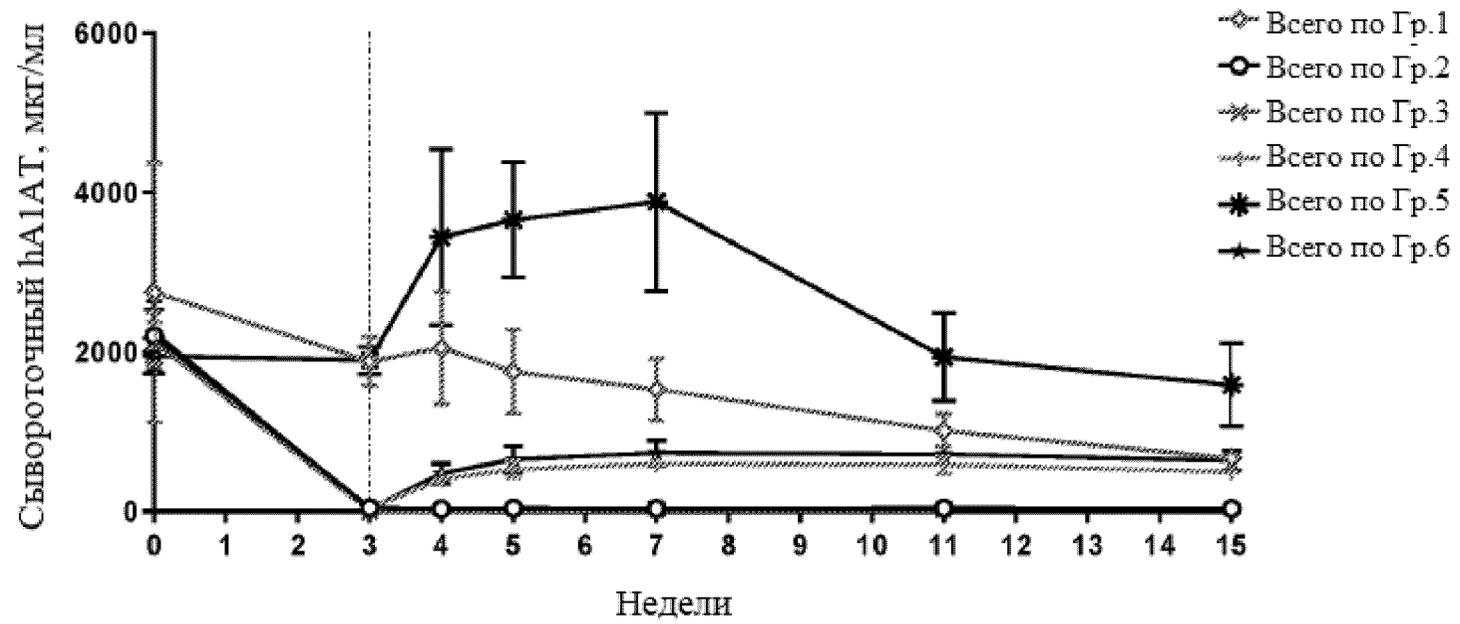


ФИГ. 12

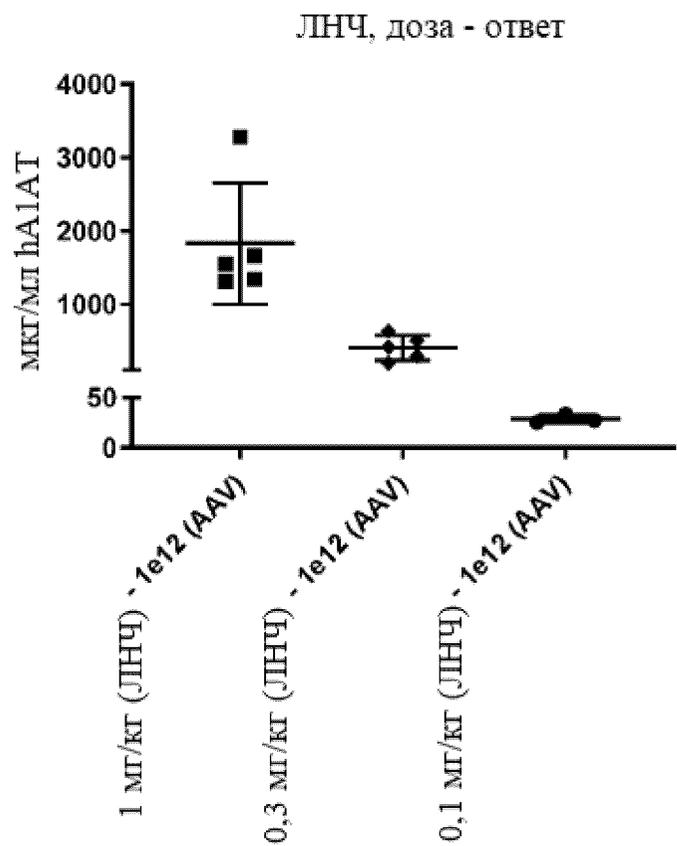


Фиг. 13А

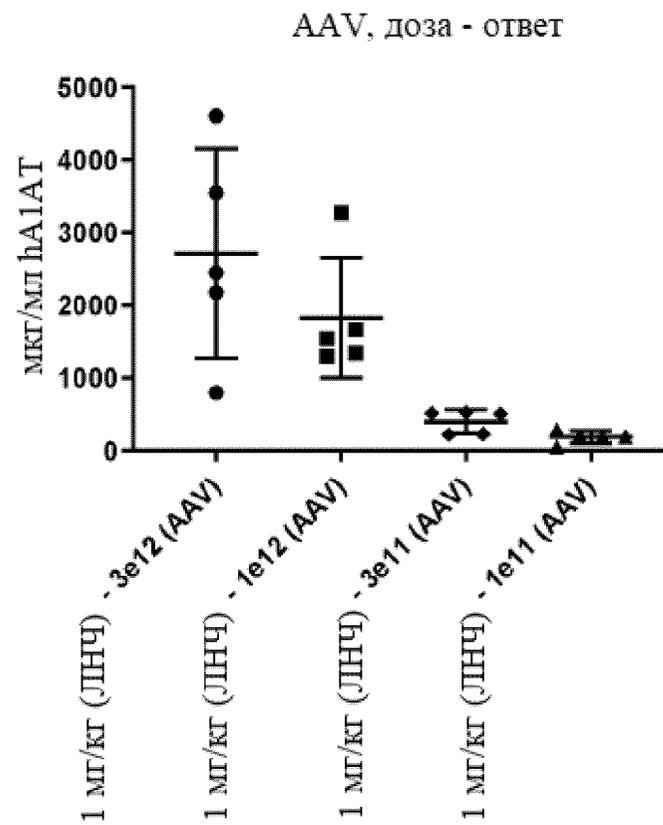
А1АТ ЖХ-МС/МС



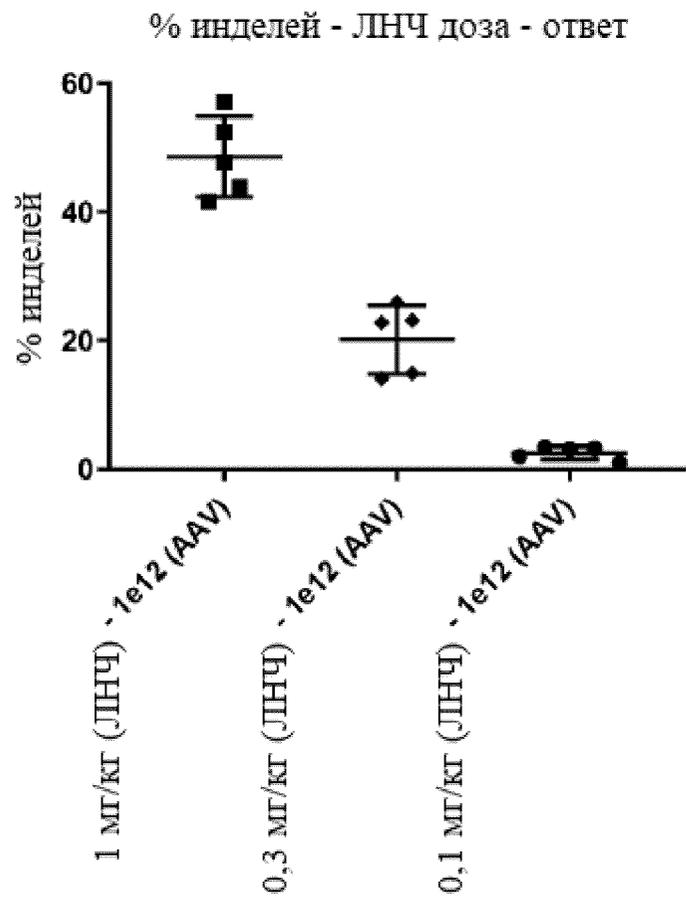
Фиг. 13В



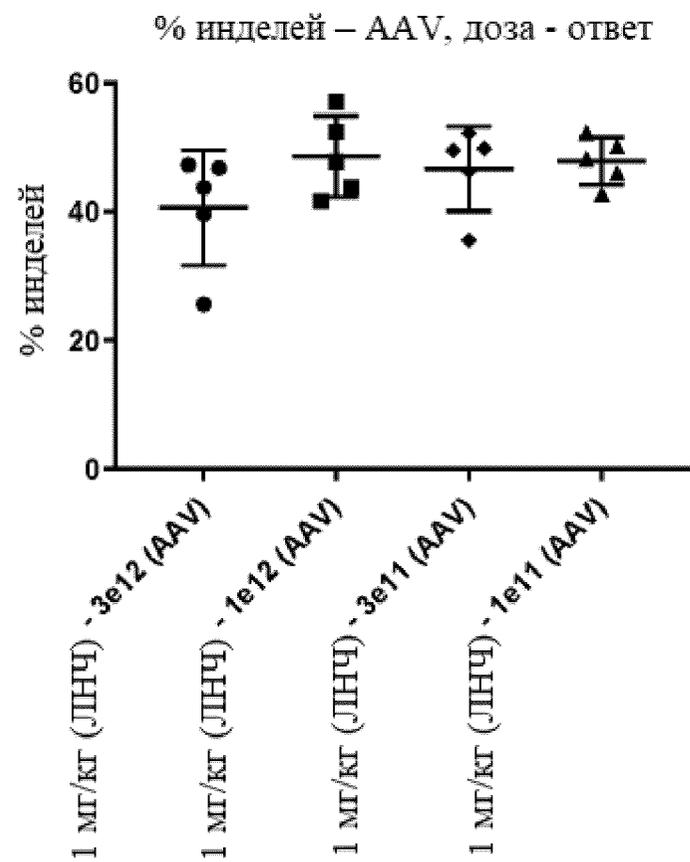
Фиг. 14А



Фиг. 14В

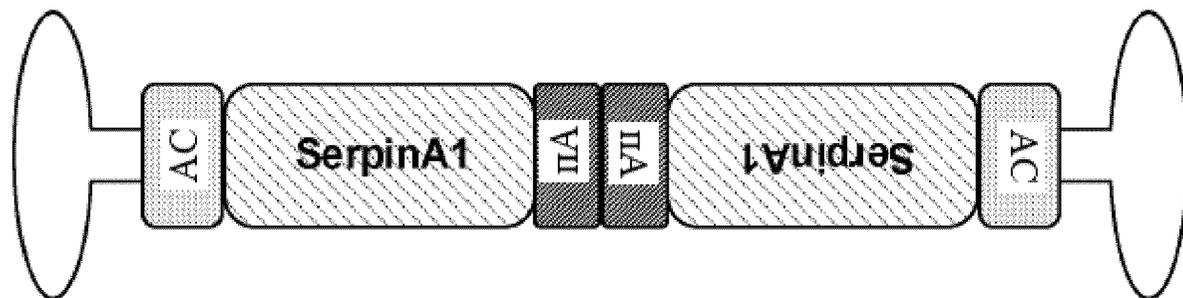


Фиг. 14С

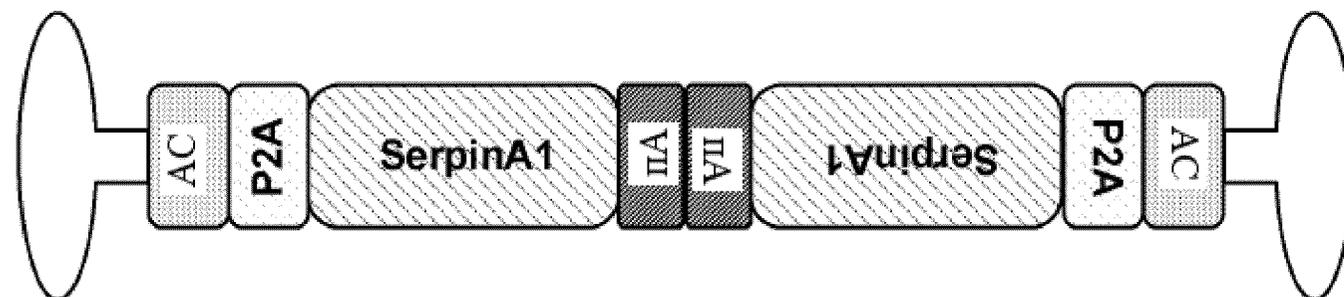


Фиг. 14D

ssAAV8 P00450



ssAAV8 P00451



Фиг. 15